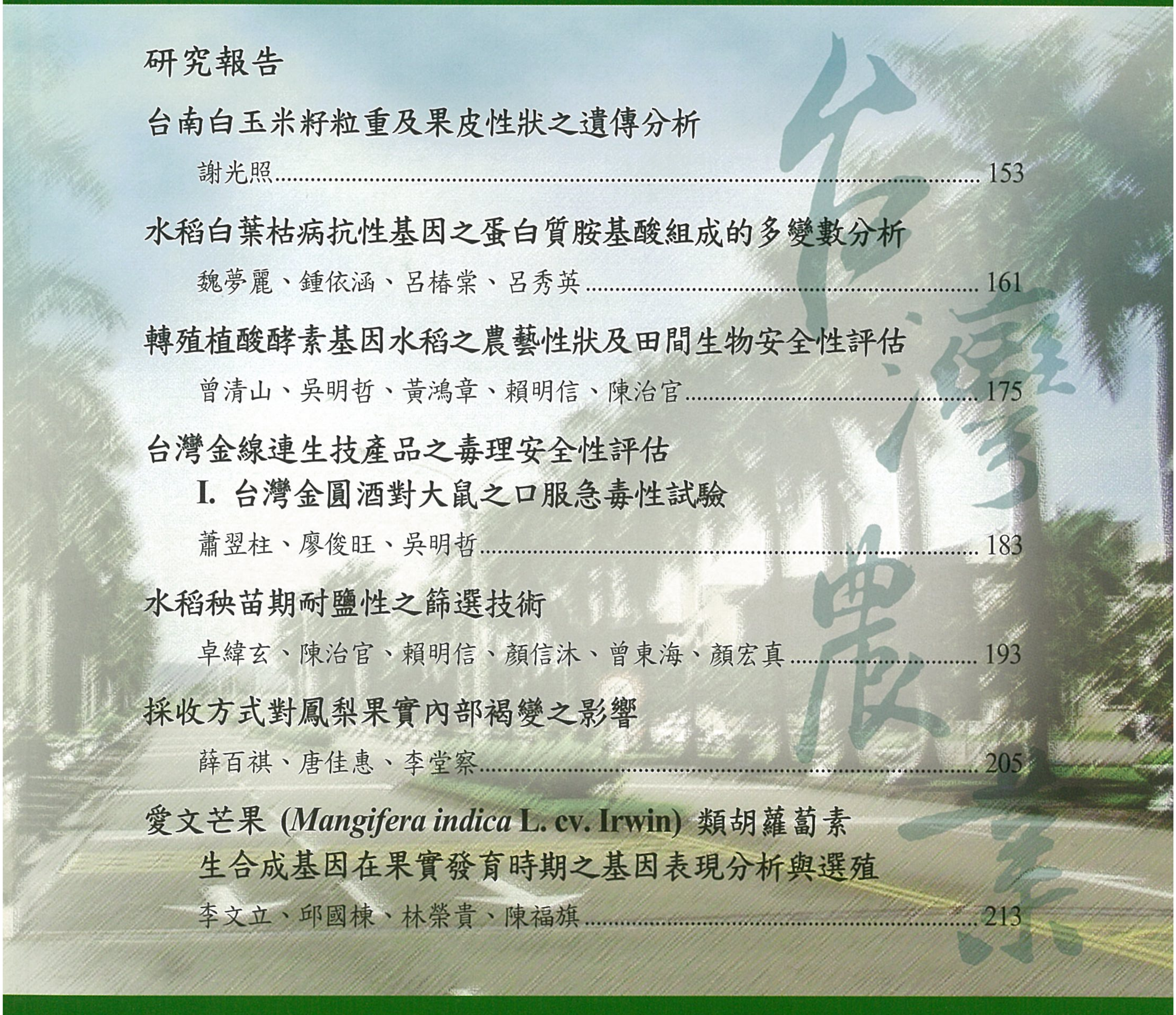
ISSN 0022-4847

台灣農業研究

第五十七卷　　第三期



研究報告

台南白玉米籽粒重及果皮性狀之遺傳分析
謝光照 153

水稻白葉枯病抗性基因之蛋白質胺基酸組成的多變數分析
魏夢麗、鍾依涵、呂椿棠、呂秀英 161

轉殖植酸酵素基因水稻之農藝性狀及田間生物安全性評估
曾清山、吳明哲、黃鴻章、賴明信、陳治官 175

台灣金線連生技產品之毒理安全性評估
I. 台灣金圓酒對大鼠之口服急毒性試驗
蕭翌柱、廖俊旺、吳明哲 183

水稻秧苗期耐鹽性之篩選技術
卓緯玄、陳治官、賴明信、顏信沐、曾東海、顏宏真 193

採收方式對鳳梨果實內部褐變之影響
薛百祺、唐佳惠、李堂察 205

愛文芒果 (*Mangifera indica* L. cv. Irwin) 類胡蘿蔔素生合成基因在果實發育時期之基因表現分析與選殖
李文立、邱國棟、林榮貴、陳福旗 213

中華民國九十七年九月
行政院農業委員會農業試驗所出版
中華民國 台灣 台中縣 霧峰鄉

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 57(3):153–160 (2008)

台南白玉米籽粒重及果皮性狀之遺傳分析[1]

謝光照[2,3]

摘　　要

謝光照。2008。台南白玉米籽粒重及果皮性狀之遺傳分析。台灣農業研究 57:153–160。

以栽培於台灣不同地區玉米台南白族群自交分離之自交系 13 個 (其中 6 個來自台中族群，其餘 7 個分別來自不同地區之族群) 及其相互雜交而成之半全互交 F_1 組合為材料，進行籽粒及果皮性狀之遺傳分析。所調查的性狀包括籽粒重、發芽面果皮厚度、非發芽面果皮厚度、果皮含量、平均果皮厚度等。以 Hayman's (1954a, b) 之方法分析，結果顯示所有調查性狀，除受累加性基因控制外，同時受複雜的顯性基因所控制，除了籽粒重以外，其餘果皮性狀均呈現累加性效果大於顯性效果，其 h^2/H_2 值介於 1.62–6.09，表示有 2–7 個顯性基因群控制其顯性效果的表現。籽粒重之顯性效果受 7 群基因所控制，而此顯性基因具有增量效應；果皮性狀之顯性效果則受 2–5 群基因所控制，而此顯性基因具有減量效應。調查性狀之狹義遺傳率介於 0.45–0.76。由農藝性狀的遺傳組成分析結果顯示，具有較薄果皮之自交系 TNWB 及 TNW3 可望為獲選的對象。

關鍵詞：玉米、果皮、遺傳分析。

前　　言

台南白玉米為一天然授粉品種，馬齒型，具有籽實大、植株及果穗性狀變異性極大之特性 (Shieh & Thseng 1998)，在台灣一年四季皆有種植。由於種子係由農民自行留種及推廣，經由長期天然淘汰及農民有意或無意選種的結果，使得台南白玉米成為適應性良好、病蟲害抗性強，且具有特殊的咀嚼感及風味，深受農民及消費者喜愛，故種原一直流傳於市場上。

一般玉米果穗在未成熟前 (乳熟期) 採收而食用者，統稱為鮮食用玉米 (green corn)。而在熱帶地區，大部份鮮食用玉米係利用飼料玉米 (field corn) 在授粉後 20–25 天，正處於乳熟期階段的鮮果穗 (Brewbaker 1982) 或糯質玉米 (waxy)、甜玉米 (sugary, sugary-2)、超甜玉米 (shrunken-2, brittle-1) 等類型之乳熟期果穗，以水煮或碳烤當作休閒食品。目前已知爆裂種 (Richarson 1960)、馬齒種 (Helm & Zuber 1969; Ho *et al.* 1975)、飼料玉米 (Ito & Brewbaker 1991)、甜玉米 (Tracy & Galinat 1987) 等不同類型玉米之果皮厚度均有差異；而爆裂種、馬齒種與超甜玉米之薄果皮對厚

---

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2323 號。接受日期：97 年 5 月 26 號。
2. 本所作物組研究員。台灣 台中縣 霧峰鄉。
3. 通訊作者，電子郵件：x486045@wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04)23399544。

果皮呈部份顯性 (Richardson 1960; Ho *et al.* 1975; Ito & Brewbaker 1991)，可以利用選種法來改良果皮厚度。

果皮的柔軟性 (tenderness) 為影響鮮食玉米品質好壞的一個重要因子，且與果皮的厚度呈顯著負相關 (Bailey & Bailey 1938; Ito & Brewbaker 1981)。美國的地方品種極多，其中粉質種 (floury) 及食用白玉米一般具有較薄的果皮，而果皮厚度超過 75 μm 的地方品種，因食用時口感粗糙，果皮殘渣多，較不為消費者所接受 (Brewbaker *et al.* 1996)。

由前人的研究顯示爆裂種玉米一般具有較厚之果皮，介於 139–175 μm (Richardson 1960)，而經選拔的甜玉米和超甜玉米雜交種其果皮厚度介於 40–60 μm (Tracy & Schmidt 1987)；國內未改良的台南白族群其果皮厚度介於 57–240 μm，具有明顯的遺傳變異存在，有極大的改良空間 (Shieh 2005)。本研究主要在探究台南白果皮性狀之遺傳行為，以做為台南白果皮改良上之依據。

材料與方法

本試驗以台南白台中族群分離所選之自交系 A、2、3、5、6、9 及其他七個不同地區台南白族群之自交系 (B、C、D、E、F、G、H) (Shieh & Thseng 1998)，及其半全互交之 78 個 F_1 雜種 (不含反交)，共計有 91 個基因型為材料。F_1 雜種與自交系分別種植於隔鄰之畦。田間試驗於 1996 年秋 (9 月 23 日播種) 在農試所進行。田間設計為逢機完全區集設計 (RCBD)，四重複，F_1 為單行區，自交系為 4 行區，行長 4.5 m，行株距為 80 × 30 cm。公頃三要素肥料量為 $N:P_2O_5:K_2O = 200:90:60$ kg，基肥以台肥 39 號複合肥料 ($N:P_2O_5:K_2O = 12:18:12$) 每公頃施 500 kg，即基肥施氮素 60 kg，磷肥 90 kg 及鉀肥 60 kg。其餘不足之氮素 140 kg 則以硫酸銨 (N = 21%) 於玉米長至齊膝期時當追肥施用。其餘之田間管理按實際需要進行之。

每行均以人工兄弟妹交配授粉且套袋 4 穗，以防其它基因型之花粉汙染，待果穗達生理成熟時採收，烘乾至 13.5%含水量，然後存於冰箱內。每基因型各重複取 10 粒生理成熟之飽滿籽粒進行果皮性狀檢測。

玉米籽粒果皮剝取之方法，參考 Helm & Zuber (1970) 之報告稍作修正，剝取和測定步驟如下：1. 達生理成熟期之種子，烘乾後稱其籽粒重，然後存放 10℃冷藏室內。2. 剝皮時取出烘乾冷藏之種子，在室溫下浸水二天使質地變軟後，再以解剖刀剝取果皮。先切下頂蓋 (tip cop)，再沿著發芽面 (germinal) (胚所在之面) 切下發芽面之果皮，然後沿著非發芽面 (abgerminal) 切下非發芽面之果皮，最後取下冠蓋 (crown cap) 及兩邊 (sides) 之果皮。3. 剝下之果皮放置於體積比為 1 份水：3 份甘油醇 (glycerol) 之溶液中，過夜。4. 倒掉溶液，取出果皮，用吸水紙將果皮表面擦乾。5. 利用厚薄計測量發芽面、非發芽面上中下三點之厚度 (μm)，以平均值記錄之。6. 測完厚度後之果皮，再以清水清洗果皮，然後將果皮放置於 70℃乾燥機中烘 4 hrs 後，秤量果皮重量，再以籽粒重換算成果皮含量。每粒籽粒調查的性狀包含有：籽粒重 (mg/kernel)、發芽面果皮厚度 (μm)、非發芽面果皮厚度 (μm)、果皮含量 (%) 及平均果皮厚度 (μm) 等五性狀。

所獲得之數據以 Hayman (1954a, b) 進行農藝性狀遺傳介量之估算。各遺傳參數所代表意義如下：a. 變因 (累加性作用) 顯著，表示親本間有極大之遺傳變異。b. 變因 (顯性效果) 顯著，表示各雜交組合間有明顯之顯性效果。b_1 變因 (平均顯性效果) 顯著，表示平均顯性效果對上述顯性效

果有明顯影響，亦即遺傳因子為單向之作用。b_2 變因顯著，表示顯性效果是由遺傳因子頻度 (genetic frequence) 不相等所造成的。b_3 變因顯著，表示顯性效果係由特殊組合力 (specific combining ability) 所造成。D 值表示基因之累加性作用 (additive effect of gene)。H_1 值表示基因之顯性作用。H_2 值表示組合的顯性作用。D-H_1 值為正值表示性狀之因子作用為累加性效果大於顯性效果，負值表示顯性效果大於累加性效果。E 值 (環境作用) 顯著，表示性狀易受環境之影響。$(H_1/D)^{1/2}$ 值 (平均顯性程度) 大於 1.3 表示超顯性，等於 0.76–1.3 顯性，介於 0.26–0.75 為不完全顯性，小於 0.25 為無顯性。$H_2/4H_1$ 值表示親本正負效應基因之比值，當偏離 0.25 即表示其顯性作用大部分是正負效應基因頻度分布不均所造成；Kd/Kr 值 (顯隱性基因之比值) 等於 1 表示顯隱性基因數目大約相等，大於 1 表示顯性基因數目多於隱性基因數目，小於 1 表示隱性基因較多。h^2/H_2 值表示控制各性狀之顯性基因群數。親本間 Wr＋Vr 值大小，表示親本間之顯性順序。Y 表示親本之外表型觀測值，而 Y 與 Wr＋Vr 之相關係數 (r) 為顯著負值表示顯性基因為增量基因，顯著正值表示顯性基因為減量基因，不顯著表示其顯性無一定作用方向。Wr/Vr 之迴歸線截於 Wr 軸原點以上，表示控制性狀之基因為不完全顯性；截於 Wr 軸原點上，表示為完全顯性基因控制；截於 Wr 軸原點下方，表示有超顯性之作用。

結　果

本試驗以台南白之台中族群分離所選之自交系 A、2、3、5、6、9 及其他七個不同地區台南白族群之自交系 (B、C、D、E、F、G、H) (表 1)，及其半全互交 78 個 F_1 雜種 (不含反交)，共計有

表 1. 台南白分離培育親本自交系籽粒重和果皮性狀之平均值

Table 1. The mean values of kernel weight and pericarp characters of Tainan-white inbred line of maize

Genotype	Kernel weight (mg/kernel)	Germinal thickness (µm)	Abgerminal thickness (µm)	Pericarp content (%)	Average thickness (µm)
TNW A	382	125	125	5.95	125
TNW B	412	77	77	4.96	77
TNW C	316	135	114	6.00	125
TNW D	350	132	147	7.90	140
TNW E	535	159	197	7.60	178
TNW F	362	119	122	6.64	121
TNW G	352	190	202	10.95	196
TNW H	344	94	102	6.12	98
TNW 2	370	71	76	4.50	74
TNW 3	376	92	82	5.62	87
TNW 5	489	119	92	6.20	105
TNW 6	481	123	126	6.00	125
Range	316–535	71–190	76–202	4.50–10.95	77–196
Mean	398	120	112	6.54	112

91 個基因型爲材料。經刪掉非均質的一個親本後 (具有互補基因) 的台南白 12 × 12 半全互交之 F_1 雜交種，利用 Hayman's 之方法進行變方分析之結果 (表 2)，顯示籽粒重 (mg/kernel)、發芽面果皮厚度 (μm)、非發芽面果皮厚度 (μm)、果皮含量 (%)、平均果皮厚度 (μm) 等性狀，其 a (累加性作用)、b (顯性效果)、b_1 (平均顯性效果對顯性效果之影響)、b_2 (基因頻度分布不均對顯性效果之影響) 及 b_3 (特殊組合力對顯性效果之影響) 等變因皆達極顯著；而各性狀之 a 均方值大於 b 均方值。b 變因之變方均呈 $b_1 > b_2 > b_3$ 大小之趨勢，表示性狀一般存在顯性效果，但因自交系之不同而有異，並存在具有較大顯性效果之組合。

估計其遺傳成分之結果 (表 3)，發現所有性狀之 D (基因的累加性作用)、H_1 (基因的顯性作用)、H_2 (雜交組合造成的顯性作用)、h^2 (所有雜交組合之顯性效應) 與 D-H_1 (累加性作用與顯性作用之差) 等遺傳組成分均達顯著，顯示這些性狀的表現，除受累加性基因控制外，同時受複雜的顯性基因所控制，其中籽粒重及發芽面果皮厚度之基因的顯性效果大於基因的累加性效果。由表 3 也可看出所調查的 5 個性狀中，籽粒重之 $(H_1/D)^{1/2}$ 值介於 0.76–1.3 呈顯性效果；而發芽面果皮厚度、非發芽面果皮厚度、果皮含量及平均果皮厚度等性狀之 $(H_1/D)^{1/2}$ 值均小於 0.75，表示爲部份顯性基因所控制。所有性狀之 $H_2/4H_1$ 值均偏離 0.25，表示正效應與負效應基因分布不均。所有性狀之 Kd/Kr 大於 1，表示以顯性基因居多。所調查性狀的 h^2/H_2 值介於 1.62–6.09，表示約有 2–7 個顯性基因群左右這些性狀顯性效果之表現，其中籽粒重之顯性效果約受 7 群基因所控制，而果皮性狀則受 2–5 個顯性基因群所控制。狹義的遺傳率介於 0.45–0.76 間，以果皮性狀具有較高的遺傳率，而籽粒重之遺傳率最低爲 0.45。籽粒重之顯性基因爲增量基因；對果皮性狀而言，顯性基因則爲減量基因。

由自交系的平均值可看出，對果皮性狀而言，TNWA、B、D 及 TNW3 四個自交系則具有較多減量之顯性基因；相對的 E 及 G 兩個自交系則具有較多增量之隱性基因。

表 2. 台南白玉米籽粒重與果皮性狀 12 × 12 全互交變方分析之均方值

Table 2. ANOVA from 12 × 12 diallel crosses for kernel weight and pericarp characters of Tainan-white maize

S.O.V.	DF	Kernel weight	Germinal thickness	Abgerminal thickness	Pericarp content	Average thickness
Block	3	6121	60	240	0.79	119
Genotype	143	10065** [z]	1565**	2176**	3.62**	1744**
a	11	61934**	15446**	21701**	33.45**	17557**
b	66	11078**	786**	1049**	2.16**	829**
b_1	1	390195**	18996**	9508**	21.87**	13889**
b_2	11	6664**	600**	989**	2.07**	737**
b_3	54	4957**	487**	904**	1.82**	606**
c	11	344	30	28	0.11	14
d	55	420	29	53	0.10	26
Error	429	1293	99	168	0.49	104

[z] **, Significant at 0.01 probability.

表 3. 台南白玉米籽粒重與果皮性狀 12 × 12 全互交分析之遺傳變方成分估值

Table 3. Estimates of genetic components of variance for kernel weight and pericarp characters in a 12 × 12 diallel crosses of Tainan-white maize

Genetic component	Kernel weight	Germinal thickness	Abgerminal thickness	Pericarp content	Average thickness
D	4288** [z]	1116**	1758**	2.71	1371**
H_1	5987**	448**	611**	1.16**	494**
H_2	4875**	343**	440**	0.84**	362**
$\hat{h}_2$	29705**	1443**	713**	1.63**	1052**
F	2874**	581**	1031**	1.67**	776**
E	331**	24*	42*	0.12**	26*
$D-H_1$	-1699**	667**	1146**	1.54**	877**
$(H_1/D)^{½}$	1.18	0.63	0.59	0.65	0.60
$H_2/4H_1$	0.20	0.19	0.18	0.18	0.18
Kd/Kr	1.79	2.39	2.98	2.76	2.78
h^2/H_2	6.09	4.20	1.62	1.95	2.90
Heritability (%)					
Broad sense	0.88	0.94	0.93	0.88	0.95
Narrow sense	0.45	0.74	0.75	0.67	0.76
r of (Wr+Vr)/Yr	-0.44*	0.83**	0.57**	0.65**	0.74**

[Z]*, ** Significant at 0.05 and 0.01 probability, respectively.

討　　論

以 Hayman (1954a, b) 方法分析台南白玉米農藝性狀之遺傳介量與基因效應之分析結果，發現台南白玉米植株及果穗性狀係由累加性與顯性效果共同控制，其中顯性效果係由基因平均顯性效果、頻度分布不均及特殊組合力等共同控制。台南白玉米百粒籽粒重等性狀若以 $D-H_1$ 的正負值為指標，則呈現基因顯性效果大於累加性效果，同時亦顯示台南白百粒籽粒重之顯性作用係由 7 群顯性基因所控制，其顯性基因均為增量基因 (Shieh & Thseng 2002)。本試驗顯示其籽粒重顯性效果也受 7 群基因所控制，其顯性基因為增量基因與上述結果相符。

乾燥籽粒之胚乳約佔整粒的 82.9%，胚佔 11.1%，果皮佔 5.3%，頂蓋佔 0.8%。果皮的組成大部分由纖維素和半纖維素所組成，約佔 86.7%；澱粉佔 7.3%；粗脂肪佔 1.0%；蛋白質佔 3.7%；粗灰分佔 0.8%；糖分佔 0.34% (Earle *et al.* 1946)。玉米籽粒果皮係籽粒最外層的保護組織，果皮的厚度及比率一般會影響鮮食用玉米的品質 (Ito & Brewbaker 1981)，果皮厚時其柔嫩度會下降，咀嚼時口感粗糙，果皮殘渣多。

本試驗以台南白玉米果皮性狀進行遺傳分析，結果顯示係由累加性與顯性效果共同控制，以 $D-H_1$ 的正負值為指標，則呈現累加性效果大於顯性效果，同時顯示果皮性狀之顯性作用係由 2–5 群顯性基因所控制，其部份顯性基因均為減量基因 (減少果皮厚度)，與 Ho *et al.* (1975) 以馬齒種

自交系爲材料，顯示果皮厚度以累加性效應佔較大部份，狹義遺傳率爲 72%，薄果皮對厚果皮爲部份顯性之研究結果相類似。本研究所使用的自交系 TNWA、B、D 及 3 等 4 個自交系帶有較多減量之部份顯性基因，爲將來食用白玉米育成薄果皮之重要材料。

由狹義遺傳率的估算，顯示果皮性狀之狹義遺傳率介於 0.67–0.76 之間，因此在食用玉米台南白之育種中，由果皮性狀的基因效應分析結果，可知須採用可組合含有較多有利部份顯性基因的育種方法較爲有利，如輪迴選種法進行果皮性狀的族群改良，通過基因間充分重組，不斷累積有利之累加性及非累加性基因，來創造具有薄果皮的優異改良族群，此改良過的族群或可直接推廣給農民栽培；或由此改良過的族群進行自交系之分離選拔，培育出薄果皮之自交系，再經組合力檢定，選出產量高且品質更優之 F_1 雜種供推廣栽培之用。

引用文獻 (Literature cited)

Bailey, D. M. and R. M. Bailey. 1938. The relationship of the pericarp to tenderness in sweet corn. Proc. Am. Soc. Hortic. Sci. 36:555–559.

Brewbaker, J. L. 1982. Genetic improvement in green corn. p.63–68. *in* the Proceeding of Symposium on Plant Breeding. Agric. Assn. of China (Taiwan) and SABRAO. Taiwan Agricultural Research Institute. Taichung, Taiwan.

Brewbaker, J. L., L. B. Larish, and G. H. Zan. 1996. Pericarp thickness of the indigenous american races of maize. Maydica 41:105–111.

Earle, F. R., J. J. Curtis, and J. E. Hubbard. 1946. Composition of the component of the corn kernel. Cereal Chem. 44:601–606.

Hayman, B. I. 1954a. The analysis of variance of diallel table. Biometrics 10:235–244.

Hayman, B. I. 1954b. The theory and analysis of diallel crosses. Genetics 39:789–809.

Helm, J. L., D. V. Glover, and M. S. Zuber. 1970. Effect of endosperm mutants on pericarp thickness in corn. Crop Sci. 10:105–106.

Helm, J. L. and M. S. Zuber. 1969. Pericarp thickness of dent corn inbred lines. Crop Sci. 9:803–804.

Ho, L. C., L. W. Kannenberg, and R. B. Hunter. 1975. Inheritance of pericarp thickness in short season maize inbreds. Can. J. Genet. Cytol. 17:621–629.

Ito, G. M. and J. L. Brewbaker. 1981. Genetic advance through mass selection for tenderness in sweet corn. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 106:496–499.

Ito, G. M. and J. L. Brewbaker. 1991. Genetic analysis of pericarp thickness in progenies of eight corn hybrids. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 116:1072–1077.

Richardson, D. L. 1960. Pericarp thickness in popcorn. Agron. J. 52:77–80.

Shieh, G. J. and F. S. Thseng. 1998. Variation of the agronomic characters of different Tainan-white maize populations in Taiwan. J. Agric. Res. China 47:204–219. (in Chinese with English abstract)

Shieh, G. J. and F. S. Thseng. 2002. Diallel analysis of yield and other agronomic characters in Tainan-white maize (*Zea mays* L.) population. J. Agric. Assoc. China 3:445–453. (in Chinese with English abstract)

Shieh, G. J. 2005. Pericarp characters variation of different Tainan-white maize population in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 54:219–226. (in Chinese with English abstract)

Tracy, W. F. and D. H. Schmidt. 1987. Effect of endosperm type on pericarp thickness in sweet corn inbred. Crop Sci. 27:692–694.

Tracy, W. F. and W. C. Galinat. 1987. Thickness and cell layer number of the pericarp of sweet corn and some of its relatives. HortScience 22:645–647.

Wolf, M. J., I. M. Cull, J. L. Helm, and M. S. Zuber. 1969. Measuring thickness of excised mature corn pericarp. Agron. J. 61:777–779.

Diallel Analysis of Kernel Weight and Pericarp Characters in Tainan-White Maize (*Zea mays* L.) Population [1]

Guang-Jauh Shieh [2,3]

Abstract

Shieh, G. J. 2008. Diallel analysis of kernel weight and pericarp characters in Tainan-white maize (*Zea mays* L.) population. J. Taiwan Agric. Res. 57:153–160.

A half-diallel crosses were made from 13 maize (*Zea mays* L.) inbred lines selected from 8 different Tainan-white (TNW) populations. They were used to investigate the kernel weight and pericarp characters. Results from Hayman's analysis indicated that the additive gene effect and non-additive gene effect (dominance effect) were significant for all the investigated pericarp characters. The additive effect was larger than the dominance effect for all the pericarp characters. The h^2/H_2 values were ranged from 1.62 to 6.09 for the pericarp characters indicating that the traits were controlled by 2–7 gene groups. The kernel weight controlled by seven groups of dominant gene, and the dominant gene expressed with increasing kernel weight, and their narrow-sense heritability were 0.45. The pericarp thickness characters controlled by 2–5 groups of dominant gene, and the dominant gene expressed with decreasing pericarp percentage, and their narrow-sense heritabilities were ranged from 0.67 to 0.76. The inbred lines of TNW-B and TNW-3 with more dominant genes for the pericarp characters will be selected.

Key words: Maize, Tainan-white, Pericarp thickness, Gene effect.

---

1. Contribution No.2323 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: May 26, 2008.
2. Agronomist, Crop Science Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Corresponding auther, e-mail: x486045@wufeng.tari.gov.tw; Fax: (04)23399544.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 57(3):161–174 (2008)

水稻白葉枯病抗性基因之蛋白質胺基酸組成的多變數分析[1]

魏夢麗[2] 鍾依涵[3] 呂椿棠[2] 呂秀英[2,4]

摘　要

魏夢麗、鍾依涵、呂椿棠、呂秀英。2008。水稻白葉枯病抗性基因之蛋白質胺基酸組成的多變數分析。台灣農業研究 57:161–174。

蛋白質中的胺基酸組成隱藏甚多訊息，但其組成特性會因不同物種或物種內不同基因而異，故蛋白質的胺基酸組成分析成為生物資訊研究的重要課題之一。胺基酸組成特性是由多個物種或基因 (觀測值) 與 20 種胺基酸之頻率 (變數) 所構成的資料矩陣來決定，這種多維資料形式所含之訊息，最適合利用多變數分析 (multivariate analysis) 之統計技術來解析。為促進水稻白葉枯病抗病基因 (*Xa*) 蛋白質序列的結構研究，有必要針對所有已完全定序的 *Xa* 基因進行蛋白質之胺基酸組成分析。基此，本研究以 NCBI 公共資料庫內已知序列的 *Xa1*、*xa5*、*xa13*、*Xa13*、*Xa21*、*Xa26* 及 *Xa27* 等基因共 17 條蛋白質序列為供試材料，綜合運用集群分析 (cluster analysis) 及對應分析 (correspondence analysis)，來檢測不同 *Xa* 基因之蛋白質胺基酸組成的變異形式。結果顯示，根據胺基酸組成比例，可將 *Xa* 基因及其家族分成六群，各群基因之蛋白質序列中各有偏好的胺基酸。*Xa1*、*Xa21*、*Xa26* 及 *Xa27* 基因之蛋白質序列中皆以白胺酸 (leucine) 出現頻率最高；*xa13*、*Xa13* 及 *Xa27* 的丙胺酸 (alanine) 出現較多但絲胺酸 (serine) 較少；*xa13* 及 *Xa13* 也有較多的纈胺酸 (valine)；*xa5* 出現麩胺酸 (glutamic acid) 和酥胺酸 (threonine) 的頻率遠高於其他基因；所有 *Xa* 基因皆含有高比例的疏水性胺基酸。本研究揭示出多變數分析之統計技術，可有效檢測出 *Xa* 基因間蛋白質之胺基酸組成的變異形式。

關鍵詞：水稻、*Xa* 基因、蛋白質結構、胺基酸組成及屬性、集群分析、對應分析。

前　言

胺基酸是組成蛋白質的單位小分子，在蛋白質中出現的只有 20 種，其支鏈在大小、形狀、電荷、形成氫鍵的能力和化學活性方面都存在差異。正由於這 20 種胺基酸的差異，以及它們的各種組合變化的結果，影響最後所形成蛋白質的構造與特性，因此造就了結構多變、功能紛繁的蛋白質。

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2324 號。接受日期：2008 年 7 月 23 日。
2. 本所作物組助理研究員、助理研究員與研究員。台灣 台中縣 霧峰鄉。
3. 私立朝陽科技大學生物技術研究所碩士。台灣 台中縣 霧峰鄉。
4. 通訊作者，電子郵件：iying@wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04)23390528。

蛋白質的長條胺基酸序列，爲其一級構造 (primary structure)，是蛋白質最終構成的根本，各級構造的訊息都決定於胺基酸的序列，即蛋白質摺疊所含之訊息揭示在其胺基酸殘基的線性序列中 (Shi *et al*. 2005)。Wang & Wang (1999) 指出，胺基酸的分類和組成與蛋白質的分類相關，由此推論出胺基酸的分類和序列中應含有蛋白質二級結構的訊息，胺基酸的合理分類是進一步研究蛋白質的分類及預測等工作的前提及基礎。Villar & Koehler (2000) 分析序列總長度在 50 個胺基酸以下的小型蛋白質之胺基酸組成，發現某些種類的胺基酸之出現比例較高，但相對其他疏水性 (hydrophobic) 胺基酸則出現較少，此一組成之趨勢特徵有利於胜肽 (peptide) 與其目標物間的反應。Chien & Chiang (2001) 對含 20 個胺基酸以下且形成分子內雙硫鍵之自然胜肽進行胺基酸組成分析，發現從其所存在的胺基酸偏好性，似乎反應出蛋白質胜肽中形成雙硫鍵時的結構及功能上的一些特性。由此可見，蛋白質中的胺基酸組成隱藏甚多訊息。在生物演化過程中可能由於突變或基於蛋白質結構和功能所需，蛋白質中的胺基酸組成會產生變異，於是造成胺基酸組成特性在不同物種或物種內不同基因間的差異 (Tang *et al*. 2004; Bharanidharan & Gautham 2005; Yampolsky & Stoltzfus 2005)。因此蛋白質的胺基酸組成分析，成爲生物資訊研究的重要課題之一。

胺基酸組成特性是由多個物種或基因 (觀測值) 與 20 種胺基酸之頻率 (變數) 所構成的資料矩陣來決定，這種多維資料形式所含之訊息，最適合利用多變數分析 (multivariate analysis) 之統計技術來解析。多變數分析是一種綜合分析方法，能夠在多個研究對象和多個指標相互關聯的情況下分析出它們的統計規律。集群分析是多變數分析方法的一種，係利用一般邏輯程序，能根據多個變數間或研究對象的相似性與相異性，客觀地將相似者歸在同一群內，其一般原則是使同一集群內的個體差異性最小，而不同集群間的個體則具有最大差異性 (Leps & Smilauer 1999)；集群分析之結果最後以樹狀圖 (dendrogram) 的分支狀況來判斷群數。對應分析爲 Benzecri 於 1973 年所提出，又稱爲相互平均法 (reciprocal averaging, Hill 1973)，用於分析簡單二維及多維表格的行與列之間的對應關係，是一種廣泛運用到生態學 (尤其是植物生態學) 的多變數統計分析技術，現已大量應用到其他各方面的研究領域 (Beh 2004)，包括基因組分析上之各種應用 (Gupta & Ghosh 2001; Tekaia *et al*. 2002; Tan *et al*. 2004)。對應分析對於數據的要求比較簡單，不需要有嚴格的線性關係，也無須限定所處理的資料是連續或離散變數，只需要是一個列聯表 (contingency table) 的資料形式，即可將多維之變數或樣本於一個低維空間上以一個序列分佈圖 (ordination diagram) 呈現；藉由序列分佈圖，不但可用來檢測變數間或樣本間的關係，也能從各變數或樣本落在序列分佈圖上之距離遠近，來輔助集群分析之樹狀圖的分群結果判斷，倘發現點間有群團現象表示可能是同一群。因此，綜合運用集群分析與對應分析，將可瞭解不同基因間之蛋白質序列中胺基酸組成的相似與相異程度，並據此判斷基因間的群聚關係。

水稻白葉枯病 (rice bacterial blight) 是由黃單孢桿菌 (*Xanthomonas oryzae pv. Oryzae*, *Xoo*) 引起的一種細菌性維管束病害，爲世界性主要稻作病害之一。目前雖然已有藥劑能針對此病害進行防治，但育成抗病品種爲解決此病害最有效之方法 (Chang 1995)，因此瞭解水稻白葉枯病抗性基因 (*Xa*) 的結構，有利於水稻的分子育種 (Bai *et al*. 2003; Monosi *et al*. 2004; Zhou *et al*. 2004)。至 2007 年 3 月 31 日截止，日本的 NIG (National Institute of Genetics) 之 Oryzabase 資料庫 (http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/top/top.jsp, Yamazaki & Jaiswal 2005) 內已登記命名 32 個 *Xa* 基因，其中已完全定序的有 *Xa1*、*xa5*、*xa13*、*Xa13*、*Xa21*、*Xa26* 及 *Xa27* 7 個基因 (Song *et al*. 1995; Yoshimura

et al. 1995, 1998; Anjali & McCouch 2004; Gu *et al*. 2005; Sun *et al*. 2006)。植物抗病機制中，有兩套基因系統先後作用，一為抗病基因 (resistant gene, R gene)，二為防衛基因。R 基因能特異性的識別病原菌對應之無毒 (Avr) 基因的產物，兩者可直接或間接地相互作用而刺激植物的訊號傳遞系統，最後誘導出植物防衛基因的表達，使植物表現出抗病性，同時 R 基因能不斷進化，可對病原菌不斷突變所產生的生理小種產生抗性 (Wang *et al*. 2002)。植物 R 基因的表現蛋白質結構分為五類 (Baker *et al*. 1997)：(1) 含有核苷酸結合位置 (nucleotide binding sites, NBS) 的細胞質受體類蛋白 (cytoplasmic receptor-like proteins) 和多白胺酸重複 (leucine-rich repeat, LRR) 序列區域，簡稱為 NBS-LRR；(2) 絲胺酸-酥胺酸激酶 (serine-threonine kinase)；(3) 含有大量細胞質外 LRR 區域的穿膜受體 (transmembrane receptor)；(4) 含細胞外 LRR 區域之穿膜受體和細胞內絲胺酸-酥胺酸激酶 (intracellualar serine-threonine kinase) 區域；及 (5) 其他。R 基因的發現，使水稻的抗病機制在分子層次研究上有了突破性的發展，且由於水稻的 *Xa* 基因在演化上的保守性與差異性，揭示出 *Xa* 基因可能存在較複雜的分子機制 (Guo *et al*. 2005)。已知 *Xa1* 為上述第一類 R 基因，而 *Xa21* 和 *Xa26* 為第四類 R 基因，至於 *xa5*、*xa13*、*Xa13* 及 *Xa27* 之抗病防禦系統的生化途徑異於 *Xa1*、*Xa21* 和 *Xa26*，其表現蛋白質結構尚未清楚，目前被歸於其他之第五類 R 基因 (Yoshimura *et al*. 1998; Khush & Angeles 1999; Anjali & McCouch 2004; Gu *et al*. 2005; Sun *et al*. 2006)。為有利於瞭解不同 *Xa* 基因之蛋白質序列的結構差異，因此本研究利用多變數分析法之集群分析與對應分析，來探討這些已定序的 *Xa* 基因之蛋白質胺基酸組成的變異形式。

材料與方法

Xa 基因序列之蒐集與下載

本研究透過 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 之 GenBank 資料庫 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html, Guisez *et al.* 1993) 下載已定序之 *Xa* 基因的編碼區序列 (coding domain sequence, CDS) 和蛋白質序列，這些已知 *Xa* 基因的相關資訊整理如表 1，其 CDS 長度介於 318-5,409 bp 之間，來源包含有印度型水稻 (*Oryza sativa indica* caltivar-group)、日本型水稻 (*japonica*)、長花藥野生稻 (*Oryza longistaminata*)。其中 *Xa1* 分別於 1999 年和 2004 年登錄有兩條序列 (本文簡稱 *Xa1_1999* 和 *Xa1_2004*)，各位於第 4 條與第 10 條染色體；*xa5* 為一隱性基因，位於第 5 條染色體上；*Xa13* 及 *xa13* 分別為顯、隱性基因，皆位於第 8 條染色體上；*Xa21* 基因家族位於第 11 條染色體，包含七個成員分別為 *Xa21-A1*、*Xa21-A2*、*Xa21-B*、*Xa21-C*、*Xa21-D*、*Xa21-E* 及 *Xa21-F*；*Xa26* 基因家族位於第 11 條染色體，包含 4 個成員分別為 *Xa26-MRKa*、*Xa26-MRKb*、*Xa26-MRKc* 及 *Xa26-MRKd* (本文簡稱 *Xa26a*、*Xa26b*、*Xa26c* 及 *Xa26d*)；*Xa27* 位於第 6 條染色體。所蒐集共 17 條基因之序列中 *Xa21-A2*、*Xa21-C*、*Xa21-F* 及 *Xa26d* 等 4 個基因只有 CDS 序列，在 NCBI 中尚未登錄有完整的蛋白質序列，故本研究將此四條 CDS 另利用 BioEdit 生物資訊軟體 (Biological Sequence Alignment Editor for Win95/98/NT/2K/XP; http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html, Hall 2001) 將其轉譯成蛋白質序列，合計共 17 條蛋白質序列。

多變數分析在 *Xa* 基因之蛋白質胺基酸組成的應用

為探討各 *Xa* 基因及其家族間胺基酸組成之相似及相異程度，首先計算各 *Xa* 基因及其家族之蛋白質序列中各種胺基酸所佔比例，然後利用 STATISTICA 統計軟體 (Statsoft Inc. 2002) 以非加權

表 1. Oryzabase 及 NCBI 資料庫中已定序之 *Xa* 基因的資訊摘要 (至 2007 年 3 月 31 日止)

Table 1. Information summary of known sequences in rice *Xa* genes from Oryzabase and NCBI databases (update time: March 31, 2007)

Label	Gene symbol	Submitted year	Accession no. in NCBI	Definition	Gene length	Chr. no	CDS Location	CDS Length	Protein sequence Accession no.	Protein sequence Length
Xa1_1999	*Xa1*	1999	AB002266	*Oryza sativa* (*indica* cultivar-group) mRNA for *Xa1*	5910	4	113..5521	5409	BAA25068	1802
Xa1_2004	*Xa1*	2004	NM_194685	*Oryza sativa* (*japonica* cultivar-group) putative bacterial blight resistance protein *Xa1*-like protein, mRNA	4206	10	1..4206	4206	NP_919667	1401
xa5	*xa5*	2004	AY643716	*Oryza sativa (indica* cultivar-group) transcription factor IIA gamma subunit (TFIIAγ) mRNA, partial cds.	318	5	1..318	318	AAV53715	106
xa13	*xa13*	2006	DQ421394	*Oryza sativa (indica* cultivar-group) cultivar IRBB13 disease resistant allele *xa13* (*xa13*) gene, complete cds.	924	8	1..924	924	ABD78942	307
Xa13	*Xa13*	2006	DQ421395	*Oryza sativa (indica* cultivar-group) cultivar IR64 disease resistant allele *XA13* (*Xa13*) gene, complete cds.	924	8	1..924	924	ABD78943	307
Xa21-A1	*Xa21*	1997	U72725	*Oryza longistaminata* receptor kinase-like protein gene	8416	11	4771..7384,7676..8052	2991	AAB82755	996
Xa21-A2	*Xa21*	1998	U72727	*Oryza longistaminata* receptor kinase-like protein, pseudogene sequence	5940	11	2151..4764,4872..5248	2991	-	996 [z]
Xa21-B	*Xa21*	1995	U37133	*Oryza sativa* (*indica* cultivar-group) receptor kinase-like protein gene	3921	11	1..2677,3521..3921	3078	AAC49123	1025
Xa21-C	*Xa21*	1998	U72723	*Oryza longistaminata* receptor kinase-like protein gene, pseudogene	19639	11	15118..17720, 17827..18201	2978	-	992 [z]
Xa21-D	*Xa21*	1997	U72726	*Oryza longistaminata* receptor kinase-like protein	13341	11	2367..4205	1839	AAB82753	612
Xa21-E	*Xa21*	1997	U72724	*Oryza sativa* (*indica* cultivar-group) receptor kinase-like protein gene	9424	11	2819..5260	2442	AAB82756	813
Xa21-F	*Xa21*	2005	U72728	*Oryza longistaminata* receptor-like kinase protein, pseudogene sequence	7204	11	1683..4352,5147..5547	3071	-	1023 [z]
Xa26a	*Xa26*	2006	DQ355952	*Oryza sativa* (*indica* cultivar-group) receptor kinase MRKa	3401	11	14225..17135,17240..17625	3297	ABD36511	1098
Xa26b	*Xa26*	2006	DQ355952	*Oryza sativa* (*indica* cultivar-group) bacterial blight resistance protein *Xa26*	3631	11	21725..24659,24765..25141	3312	ABD36512	1103
Xa26c	*Xa26*	2006	DQ355952	*Oryza sativa* (*indica* cultivar-group) receptor kinase MRKc	3456	11	34496..34911,35026..37951	3342	ABD36513	1113
Xa26d	*Xa26*	2006	DQ355952	*Oryza sativa* (*indica* cultivar-group) cultivar Minghui 63 receptor kinase pseudogene	11396	11	2021..3423,9305..10839, 13028..13416	3327	-	1109 [z]
Xa27	*Xa27*	2005	AY986491	*Oryza sativa* (*indica* cultivar-group) *Xa27* gene, *Xa27*-IR24 allele	2393	6	1590..1931	342	AAY54163	113

[z] Protein sequence translated from CDS using BioEdit software.

配對算術平均法 (unweighted pair group method using arithmetic average, UPGMA) 進行集群分析，以求得歸群樹狀圖。UPGMA 是集群分析的演算方法之一，以群間個體所有成對距離的平均值爲判斷，較不受離群值影響 (Mohna *et al*. 1992; Mumm *et al*. 1994)。接著，同樣再利用 STATISTICA 統計軟體進行對應分析，由其行列之間的對應關係，求得序列分佈圖，以呈現基因間蛋白質胺基酸組成之關係。最後綜合集群分析之樹狀圖和對應分析之序列分佈圖的結果，來共同決定群數。

各群 *Xa* 基因之蛋白質胺基酸的組成及屬性比較

根據上述分群結果，計算各群 *Xa* 基因蛋白質序列中各種胺基酸的組成比例，並利用 Excel 軟體繪製雷達圖，以進行各群 *Xa* 基因間蛋白質胺基酸組成之差異性比較。再根據胺基酸支鏈之性質 (Mathews *et al*. 2000，整理如表 2)，計算各群基因之蛋白質序列中不同屬性胺基酸所佔比例，並藉由雷達圖之呈現，來探討各群 *Xa* 基因間之蛋白質胺基酸屬性的差異。

結　果

根據 17 個 *Xa* 基因及其家族之蛋白質序列中胺基酸組成比例的集群分析，由所得之樹狀圖 (圖 1A) 可發現，在歐氏距離 13.2 時，*Xa* 基因及其家族可被分成四群：*Xa1_1999*、*Xa1_2004*、*Xa21-C*、*Xa21-F*、*Xa26d*、*Xa21-A1*、*Xa21-A2*、*Xa21-B*、*Xa21-D*、*Xa21-E*、*Xa26a*、*Xa26b* 及 *Xa26c* 爲同一群，*xa13* 和 *Xa13* 自成一群，*xa5* 和 *Xa27* 則各自成群。進而由對應分析所得之序列分佈圖上各基因落點之距離遠近，大致也可將 *Xa* 基因及其家族分成四群，此與集群分析之結果一致 (圖 1 B)。然而，由於考慮到 *xa5*、*xa13*、*Xa13* 及 *Xa27* 之蛋白質序列的長度 (106-307 base) 相較於其他 *Xa* 基因甚短，因此移去此四個基因再重新進行集群分析及對應分析。根據集群分析之樹狀圖 (圖 2A)，結果發現於歐氏距離 8.3 時，13 個 *Xa* 基因及其家族可進而被分成三群，其中 *Xa1_1999*、*Xa1_2004* 及 *Xa21-C*、*Xa21-F*、*Xa26d* 從前述群聚結果 (圖 1A) 中被分離出來而成爲兩群 (圖 2 A)。檢視對應分析之序列分佈圖，也得到一致的分群結果 (圖 2 B)。綜合圖 1 及圖 2 的兩次分群結果，*Xa* 基因之蛋白質胺基酸組成可區分成六群 (表 3)：第 I 群爲 *Xa1_1999* 及 *Xa1_2004*，第 II 群爲 *Xa21-A1*、*Xa21-A2*、*Xa21-B*、*Xa21-D*、*Xa21-E*、*Xa26a*、*Xa26b* 及 *Xa26c*，第 III 群爲 *Xa21-C*、*Xa21-F* 及 *Xa26d*，第 IV 群爲 *xa5*，第 V 群爲 *xa13* 及 *Xa13*，第 VI 群爲 *Xa27*。

表 2. 胺基酸屬性分類

Table 2. Classification of amino acid attribution

Non-Polar	Polar (Hydrophilic)		
(Hydrophobic)	Uncharged	Positively charged	Negatively charged
Alanine (Ala)	Cysteine (Cys)	Histidine (His)	Aspartic acid (Asp)
Phenylalanine (Phe)	Glycine (Gly)	Lysine (Lys)	Glutamic acid (Glu)
Isoleucine (Ile)	Asparagine (Asn)	Arginine (Arg)	
Leucine (Leu)	Glutamine (Gln)		
Methionine (Met)	Serine (Ser)		
Proline (Pro)	Threonine (Thr)		
Valine (Val)	Tyrosine (Tyr)		
Tryptophane (Trp)			

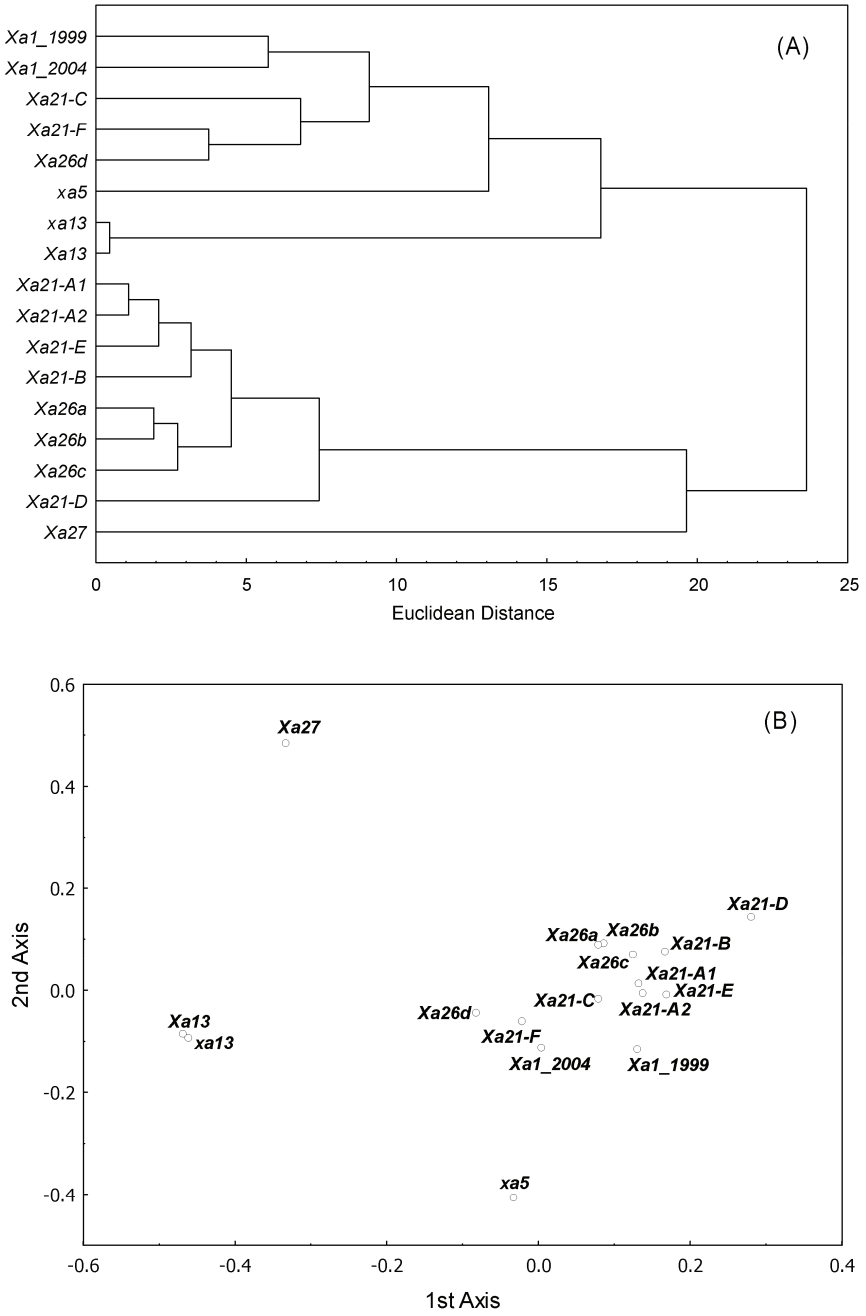


圖 1. 17 個 *Xa* 基因及其家族根據蛋白質胺基酸組成的分群結果。(A) 集群分析採 UPGMA 法之樹狀圖；(B) 對應分析之序列分佈圖。

Fig. 1. Grouping results of 17 *Xa* genes and their families according to the amino acid composition in proteins. (A) Dendrogram of cluster analysis using UPGMA, (B) Ordination diagram of correspondence analysis.

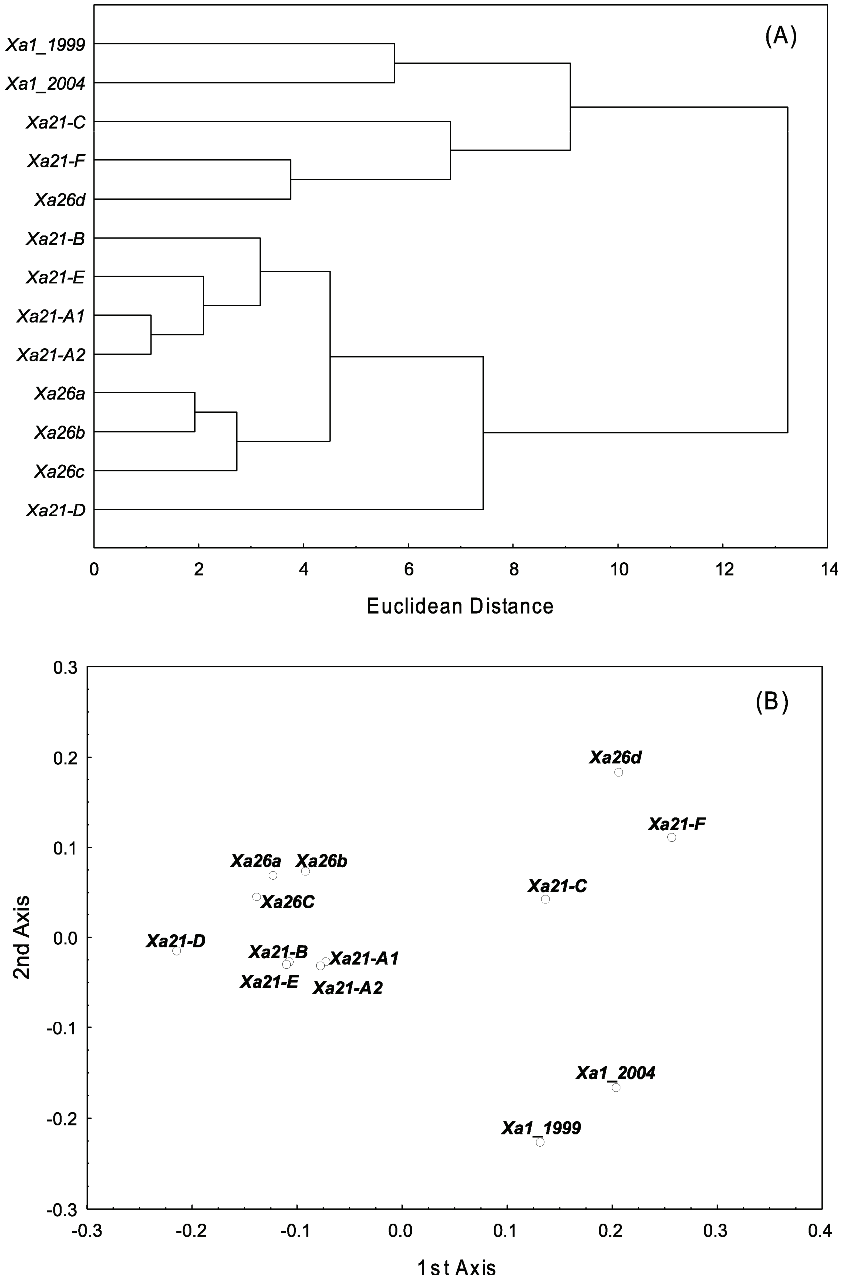


圖 2. 12 個 *Xa* 基因及其家族 (不含 *xa3*、*xa13*、*Xa13* 及 *Xa27*) 根據蛋白質胺基酸組成的分群結果。(A) 集群分析採 UPGMA 法之樹狀圖；(B) 對應分析之序列分佈圖。

Fig. 2. Grouping results of 12 *Xa* genes and their families (without *xa3*, *xa13*, *Xa13* and *Xa27*) according to the amino acid composition in proteins. (A) Dendrogram of cluster analysis using UPGMA, (B) Ordination diagram of correspondence analysis.

表 3. *Xa* 基因之蛋白質胺基酸組成比例的分群結果

Table 3. Grouping results of *Xa* genes determined from the percentage compositions of amino acids in proteins

Group	Genes							
I	*Xa1_1999*	*Xa1_2004*						
II	*Xa21-A1*	*Xa21-A2*	*Xa21-B*	*Xa21-D*	*Xa21-E*	*Xa26a*	*Xa26b*	*Xa26c*
III	*Xa21-C*	*Xa21-F*	*Xa26d*					
IV	*xa5*							
V	*xa13*	*Xa13*						
VI	*Xa27*							

由各群 *Xa* 基因表現蛋白質之胺基酸組成比例的雷達圖 (圖 3)，可清楚看出各群 *Xa* 基因對表現蛋白質的胺基酸使用確實有差異。分屬第 I、II、III 群的 *Xa1*、*Xa21* 及 *Xa26* 的蛋白質序列中皆一致出現最多的白胺酸 (Leu)，其次為絲胺酸 (Ser)，但三群基因間在蛋白質序列中的其他胺基酸之組成比例仍多少有異，其中 *Xa1* 的麩胺酸 (Glu) 出現較多而 *Xa21* 則以甘胺酸 (Gly) 和天門冬醯胺酸 (Asn) 較多。相對於其他基因，*xa13*、*Xa13* 及 *Xa27* 的丙胺酸 (Ala) 出現較多但 Ser 較少；*xa13* 及 *Xa13* 也有較多的纈胺酸 (Val)；*xa5* 出現 Glu 和酥胺酸 (Thr) 的頻率遠高於其他基因。第 VI 群之 *Xa27* 之蛋白質序列中出現 Leu 之頻率是所有基因中之最高；所有 *Xa* 基因之蛋白質序列出現色胺酸 (Trp) 的頻率都甚少。

再由各群 *Xa* 基因之表現蛋白質的不同屬性胺基酸所佔比例之雷達圖 (圖 4)，可發現各群 *Xa* 基因的蛋白質序列中皆以疏水性 (hydrophobic) 胺基酸出現較多，尤其以第 V 及 VI 群之 *xa13*, *Xa13* 及 *Xa27* 出現疏水性胺基酸之頻率最多，各高達約 58%，而第 IV 群之 *xa5* 的疏水性胺基酸雖亦多，但含量為 38%，僅略高於無電荷胺基酸所佔比例 (36%)。*Xa1*、*Xa21* 及 *Xa26* 之蛋白質的胺基酸屬性分布較相近。所有 *Xa* 基因蛋白質序列的親水性 (hydrophilic) 胺基酸中以無電荷胺基酸之比例較高 (25–39%)，而正電荷及負電荷胺基酸的含量都甚少，約佔 4–15%。

討　　論

根據本研究利用多變數分析進行 *Xa* 基因蛋白質序列中胺基酸組成比例的分群結果 (圖 1、圖 2 及表 3)，顯示第 I 群為屬第一類 R 基因的 *Xa1*，而同屬第四類 R 基因的 *Xa21* 和 *Xa26* 及其基因家族則被分成第 II、III 群，屬其他之第五類 R 基因的 *xa5*、*xa13*、*Xa13* 及 *Xa27* 分別歸於第 IV、V、VI 群。由分群結果可以發現這些 *Xa* 基因之表現蛋白質各有其胺基酸組成特性 (圖 3)，*Xa1*、*Xa21* 及 *Xa26* 都含有豐富的 Leu，這是因為它們的表現蛋白質皆含有 LRR 序列區域結構 (Song *et al*. 1995; Yoshimura *et al*. 1998; Sun *et al*. 2006)；此外，這三個 *Xa* 基因也含有豐富的 Ser，尤其是 *Xa21* 及 *Xa26* 的抗病機制含有細胞外 LRR 區域之穿膜受體和細胞內絲胺酸-酥胺酸激酶區域 (Song *et al*. 1995; Sun *et al*. 2006)，因此出現 Ser 頻率也較 *Xa1* 為高；而 *Xa1*、*Xa21* 及 *Xa26* 之間在其他胺基酸 (如 Glu、Gly 和 Asn) 的所佔比例仍多少有異。*xa13* 是 *Xa13* 顯性基因在啟動子 (promoter) 區域內序列上之突變所產生的完全隱性基因，只有在同型 (homozygous) 狀態下對黃單孢桿菌菲律賓生理小種 *Xoo* race 6 (strain PXO99) 能產生抗性 (Chu *et al*. 2006)，經本研究分析結果 *xa13* 和 *Xa13* 的表現

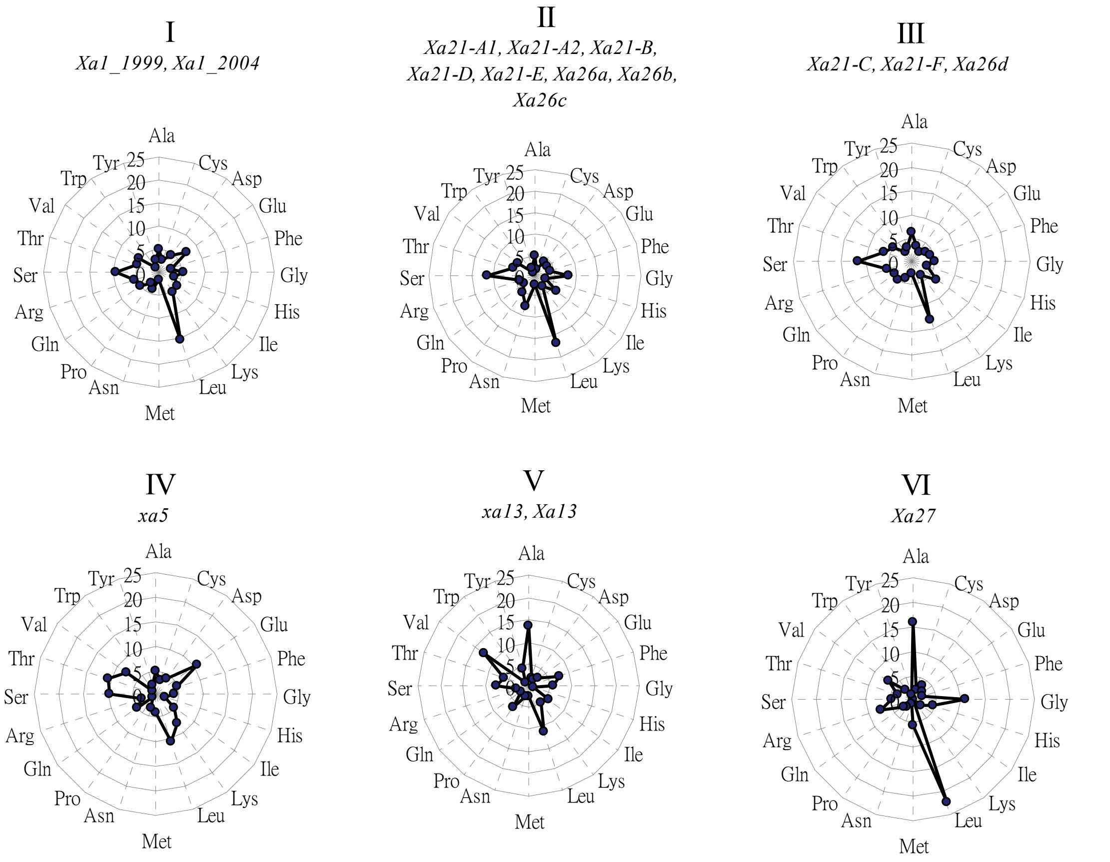


圖 3. 各群 *Xa* 基因之蛋白質胺基酸組成差異的雷達圖。

Fig. 3. Polar plot showing the compositional differences among amino acids in proteins for each *Xa*-gene group.

蛋白質之胺基酸組成被歸於同一群，經檢查兩者的蛋白質序列之編碼，發現幾乎相同，其差異僅在第 298 位置上 *xa13* 編碼為 Thr，而 *Xa13* 編碼為 Ala。*xa5*、*xa13*、*Xa13* 及 *Xa27* 4 個基因之蛋白質序列都不具有LRR結構，其R基因的表現蛋白質結構目前尚未清楚 (Yoshimura *et al*. 1998; Khush & Angeles 1999; Anjali & McCouch 2004; Gu *et al*. 2005; Sun *et al*. 2006)，但從本研究結果發現，它們的胺基酸組成特性明顯不同。*Xa27* 蛋白質序列中有非常多的 Leu 且含量遠高於其他 *Xa* 基因，按此可能與 *Xa27* 之產物內含 3 個核定位信號 (nuclear localized signal, NLS) 模組之 C 端保守區域和一個轉錄活化區的細胞核局部性第 III 型作用器有關 (Gu *et al*. 2005)。由此顯見，*Xa* 基因的蛋白質胺基酸組成類別與蛋白質結構類別相關，但同類 R 基因間的蛋白質胺基酸組成仍有差異。

胺基酸支鏈的極性 (親水性) 或非極性 (疏水性)，對形成蛋白質的整體構造與性質非常重要；疏水性強的胺基酸，通常居於蛋白質的內部，再藉由疏水性所引發之摺疊 (folding) 過程中扮演了

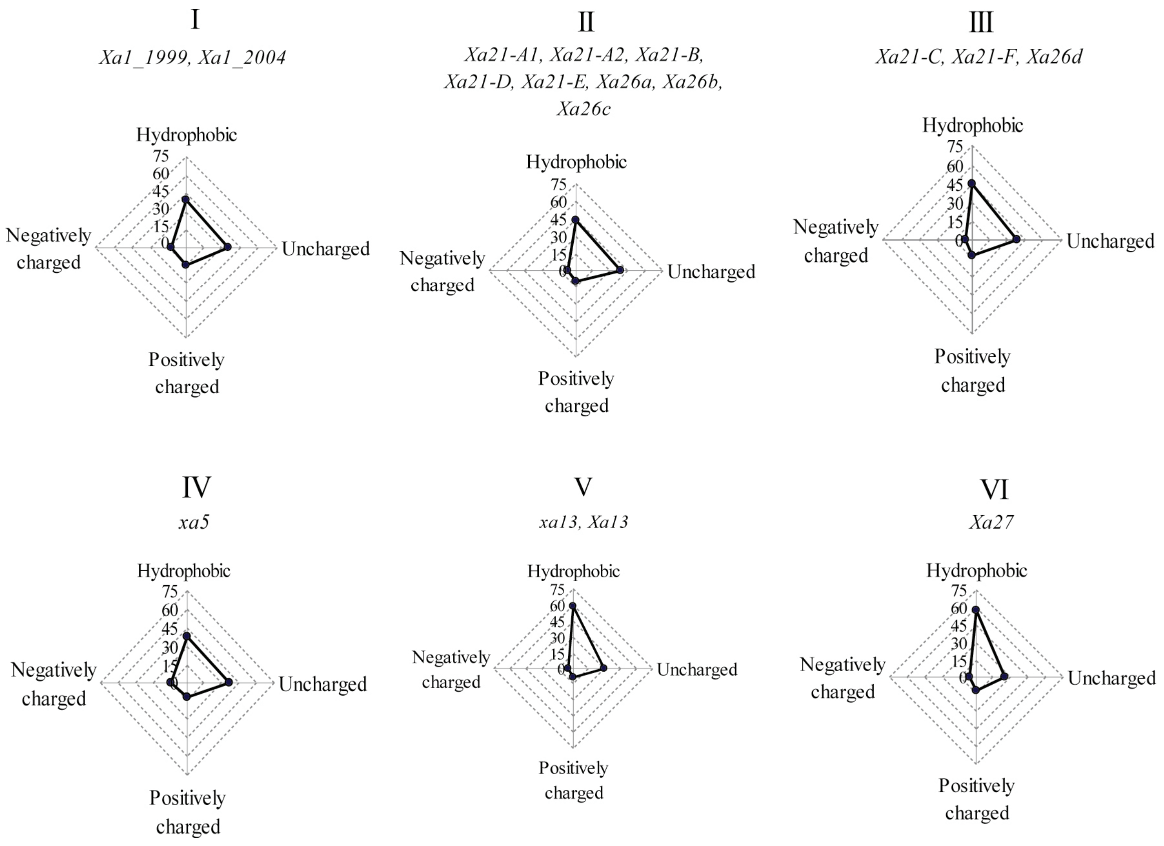


圖 4. 各群 *Xa* 基因之蛋白質胺基酸屬性差異的雷達圖。

Fig. 4. Polar plot showing the attributional differences among amino acids in proteins for each *Xa*-gene group.

重要角色 (Dill 1985; Nauchitel & Somorjai 1994; Villar & Kauvar 1994)。Mathews *et al.* (2000) 指出疏水性胺基酸多，有利於維持蛋白質的完整三級結構。藉由多變數分析進行 *Xa* 基因蛋白質胺基酸組成之分群結果，可以檢視出各群基因在胺基酸屬性分布的相似與相異程度，結果發現 7 個 *Xa* 基因之蛋白質皆含有高比例的疏水性胺基酸，但各群基因間的比例仍有差異，其中 *xa13*、*Xa13* 及 *Xa27* 基因之蛋白質序列出現疏水性胺基酸的頻率最高，而以 *xa5* 基因蛋白質最少，*Xa1*、*Xa21* 及 *Xa26* 基因表現蛋白質的胺基酸屬性分布則較相近 (圖 4)。

誌　　謝

本研究承蒙行政院農業委員會農業生物技術國家型科技計畫 (計畫編號：94 農科-5.2.1-農-C1(8)) 及國家科學委員會 (計畫編號：NSC95-2317-B-055-004) 補助經費，特致謝忱。

引用文獻 (Literature cited)

Anjali, S. I. and S. R. McCouch. 2004. The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance. Mol. Plant-Microbe Interact. 17:1348–1354.

Bharanidharan, D. and N. Gautham. 2005. Amino acid variation in cellular processes in 108 bacterial proteomes. Arch. Microbiol. 184:168–174.

Baker, B., P. Zambryski, B. Staskawicz, and S. P. Dinesh-Kumar. 1997. Signaling in plant-microbe interactions. Science 276:726–733.

Bai, J., L. A. Pennill, J. Ning, S. W. Lee, J. Ramalingam, C. R. Webb, B. Zhao, Q. Sun, J. C. Nelson, J. E. Leach, and S. H. Hulbert. 2003. Diversity in nucleotide binding site-leucine-rich repeat genes in cereals. Genome Res. 12:1871–1884.

Beh, E. J. 2004. A Bibliography of the Theory and Application of Correspondence Analysis. Vol. II-By Publication. School of Quantitative Methods and Mathematical Sciences, Univ. Western Sydney. Australia. 101 pp.

Benzecri, J. P. 1973. Lanalyse des donnees. II. Lanalyse des correspondances. Dunod. Paris, France. 619 pp.

Chang, S. J. 1995. Physiological and genetical studies on bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) resistance in rice (*Oryza sativa* L.). PhD. Grad. Inst. Agron. National Chung-Hsing Univ. Taichung. 172 pp.

Chien, W. J. and F. T. Chiang. 2001. The preference of amino acids in cyclic peptides an application of bio-information in elementary biochemistry. J. Chaoyang Univ. Technol. 6:617–628. (in Chinese with English abstract)

Chu, Z., M. Yuan, J. Yao, X. Ge, B. Yuan, C. Xu, X. Li, B. Fu, Z. Li, J. L. Bennetzen, Q. Zhang, and S. Wang. 2006. Promoter mutations of an essential gene for pollen development result in disease resistance in rice. Genes Dev. 20:1250–1255.

Dill, K. A. 1985. Theory for the folding and stability of globular protein. Biochemistry 24:1501-1509.

Gu, K., B. Yang, D. Tian, L. Wu, D. Wang, C. Sreekala, F. Yang, Z. Chu, G. L. Wang, F. F. White, and Z. Yin. 2005. R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. Nature 435:1122–1125.

Guisez, Y., J. Robbins, E. Remaut, and W. Fiers. 1993. Folding of the MS2 coat protein in *Escherichia coli* is modulated by translational pauses resulting from mRNA secondary structure and codon usage: A hypothesis. J. Theor. Biol. 162:243–252.

Guo, S. W., Y. Zhang, L. H. Sun, and D. Y. Gao. 2005. Progress on the research of bacterial blight resistance in rice. Chin. Agric. Sci. Bull. 21:339–344. (in Chinese with English abstract)

Gupta, S. K. and T. C. Ghosh. 2001. Gene expressivity is the main factor in dictating the codon usage variation among the genes in *Pseudomonas aeruginosa*. Gene 273:63–70.

Hall, T. 2001. BioEdit version 5.0.6. North Carolina State Univ. 192 pp.

Hill, M. O. 1973. Reciprocal averaging: An eigenvector method of ordination. J. Ecol. 61:237–249.

Khush, G. S. and E. R. Angeles. 1999. A new gene for resistance to race 6 of bacterial blight in rice, *Oryza sativa* L. Rice Genet. Newsl. 16:92–93.

Leps, J. and P. Smilauer. 1999. Multivariate Analysis of Ecological Data. Faculty of Biological Science. Univ. South Bohemia, Ceske Budejovice. 110 pp.

Mathews, C. K., K. E. van Holde, and K. G. Ahern. 2000. Biochemistry. Addison Wesley Longman, Inc. USA. p.126–160.

Mohna, F. I., P. Shen, S. C. Jong, and K. Orikono. 1992. Molecular evidence supports the separation of *Lentinula edodes* from *Lentinus* and related genera. Can. J. Bot. 70:2446–2452.

Monosi, B., R. J. Wisser, L. Pennill, and S. H. Hulbert. 2004. Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice. Theor. Appl. Genet. 109:1434–1477.

Mumm, R. H., J. Hubert, and J. W. Dudley. 1994. A classification of 148 U.S. maize inbreds: II. Validation of cluster analysis based on RFLPs. Crop Sci. 34:852–865.

Nauchitel, V. V. and R. L. Somorjai. 1994. Spatial and free energy distribution patterns of amino acid residues in water soluble proteins. Biophys. Chem. 51:327–336.

Shi, X. H., X. R. Liu, L. Luo, W. B. Liu, and J. Xu. 2005. A research of amino acid order based on amino acid classification. J. Biomath. 20:491–495.

Song, W. Y., G. L.Wang, L. L. Chen, H. S. Kim, L. Y. Pi, T. Holsten, J. Gardner, B. Wang, W. X. Zhai, L. H. Zhu, C. Frauquet, and P. Ronald. 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. Science 270:1804–1806.

Statsoft Inc. 2002. STATISTICA: The small book chinese version. USA. 144 pp.

Sun, X. L., Y. L. Cao, and S. P. Wang. 2006. Point mutations with positive selection were a major force during the evolution of a receptor-kinase resistance gene family of rice. Plant Physiol. 140:998–1008.

Tan, Q., K. Brusgaard, T. A. Kruse, E. Oakeley, B. Hemmings, H. Beck-Nielsen, L. Hansen, and M. Gaster. 2004. Correspondence analysis of microarray time-course data in case-control design. J. Biomed. Inform. 37:358–365.

Tang, H., J. G. J. Wyckoff, J. Lu, and C. I. Wu. 2004. A universal evolutionary index for amino acid changes. Mol. Biol. Evol. 21:1548–1556.

Tekaia, F., E. Yeramoan, and B. Dujon. 2002. Amino acid composition of genomes, lifestyles of organisms, and evolutionary trends: A global picture with correspondence analysis. Gene 297:51–60.

The Rice Chromosome 10 Sequencing Consortium. 2003. In-depth view of structure, activity, and evolution of rice chromosome 10. Science 300:1566–1569.

Villar, H. O. and L. M. Kauvar. 1994. Amino acid preferences at protein binding sites. FEBS Lett. 349:125–130.

Villar, H. O. and R. T. Koehler. 2000. Amino acid preferences of small, naturally occurring polypeptides. Biopolymers 53:226–232.

Wang, A. J., C. X. Zhu, and F. J. Wen. 2002. Molecular biology of the resistance to blight disease in rice. J. Shandong Agric. Univ. (Nat. Sci.) 33:101–106. (in Chinese with English abstract)

Wang, J. and W. Wang. 1999. A computational approach to simplifying the protein folding alphabet. Nat. Struc. Biol. 6:1033–1038.

Yamazaki, Y. and P. Jaiswal. 2005. Biological ontologies in rice databases. An introduction to the activities in Gramene and Oryzabase. Plant Cell Physiol. 46:63–68.

Yampolsky, L. Y. and A. Stoltzfus. 2005. The exchangeability of amino acids in proteins. Genetics 170:1459–1472.

Yoshimura, S., A. Yoshimura, N. Iwata, S. R. McCouch, M. L. Abenes, M. Baraoidan, T. W. Mew, and R. J. Nelson. 1995. Tagging and combining bacterial blight resistance genes in rice using RAPD and RFLP markers. Mol. Breed. 1:375–387.

Yoshimura, S., U. Yamanouchi, Y. Katayose, S. Toki, Z. X. Wang, I. Kono, N. Kurta, M. Yano, N. Iwata, and T. Sasaki. 1998. Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. Proc. Nat. Acad. Sci. 95:1663–1668.

Zhou, T., Y. Wang, J. Q. Chen, H. Araki, Z. Jing, L. Jiang, J. Shen, and D. Tian. 2004. Genome-wide identification of NBS genes in *japonica* rice reveals significant expansion of divergent non-TIR NBS-LRR genes. Mol. Genet. Genomics 271:402–415.

Multivariate Analysis of Amino Acid Composition in Proteins from Rice Bacterial Blight Resistance Genes [1]

Meng-Li Wei[2], Yi-Han Chung[3], Chun-Tang Lu[2], and Hsiu-Ying Lu[2,4]

Abstract

Wei, M. L., Y. H. Chung, C. T. Lu, and H. Y. Lu. 2008. Multivariate analysis of amino acid composition in proteins from rice bacterial blight resistance genes. J. Taiwan Agric. Res. 57:161–174.

Much information is stored in amino acid composition of proteins, while amino acid compositional features vary among species and among genes within species; thus, the analysis of amino acid composition of proteins becomes one of the important topics in bioinformatics research. The total amino acid usage is determined by obtaining a data matrix of multiple species or genes (observations) and 20 amino acid frequencies (variables). The multivariate analysis is well suited for exploring this multidimensional information. To accelerate the analysis of protein structure in rice bacterial blight resistance gene (*Xa*), it is essential to examine the amino acid composition of all completely sequenced *Xa* genes. Thus, using a total of 17 protein sequences of rice bacterial blight resistance genes, i.e., *Xa1*, *xa5*, *xa13*, *Xa13*, *Xa21*, *Xa26*, and *Xa27* collected from NCBI, as test data, the pattern of variation of amino acid composition in *Xa* genes was detected by the complementary use of correspondence analysis and cluster analysis. The results showed that *Xa* genes were divided into six groups according to their percentage compositions of amino acids. The *Xa1*, *Xa21*, *Xa26*, and *Xa27* genes were found to have leucine mostly. The *xa13*, *Xa13*, and *Xa27*genes had fewer serine but more alanine and glycine. The *xa13* and *Xa13* genes also contained much valine. The *xa5* gene had much glutamic acid and threonine compared to other *Xa* genes. All of *Xa* genes had high-frequency hydrophobic amino acid in proteins. This research showed that multivariate statistical technique is useful for detecting the variation pattern of amino acid composition of proteins among *Xa* genes.

Key words: Rice (*Oryza sativa* L.), *Xa* genes, Protein structure, Composition and attribution of amino acids, Cluster analysis, Correspondence analysis.

---

1. Contribution No.2324 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: July 23, 2008.
2. Respectively, Assistant Researcher, Assistant Researcher and Senior Researcher. Crop Science Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Master, Graduate Institute of Biotechnology, Chaoyang University of Technology, Wufeng, Taichung, Taiwan ROC.
4. Corresponding author, e-mail: iying@wufeng.tari.gov.tw; Fax: (04)23390528.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 57(3):175–182 (2008)

轉殖植酸酵素基因水稻之農藝性狀及田間生物安全性評估[1]

曾清山[2] 吳明哲[2] 黃鴻章[2] 賴明信[3] 陳治官[3,4]

摘　要

曾清山、吳明哲、黃鴻章、賴明信、陳治官。2008。轉殖植酸酵素基因水稻之農藝性狀及田間生物安全性評估。台灣農業研究 57:175–182。

轉殖植酸酵素基因水稻品系，是由水稻台農 67 號品種轉殖植酸酵素基因 (phytase-gene) 所產生的基因轉殖水稻，本研究目的在評估轉殖植酸酵素基因水稻的田間生物安全，以確保在自然環境中，對目前已有農作物耕種及環境無不良影響。本試驗於農業試驗所隔離田進行，結果顯示轉殖植酸酵素基因水稻的株高、穗長、穗重及產量顯著低於對照受體品種台農 67 號。轉殖植酸酵素基因水稻每公頃平均產量爲 4,608 kg，遠低於台農 67 號的 7,040 kg。無論是轉殖植酸酵素基因水稻或是台農 67 號，其發芽勢及發芽率均受低溫影響，在低溫 15℃環境下，轉殖植酸酵素基因水稻發芽勢低於台農 67 號，而發芽率則高於台農 67 號，二者之間有顯著的差異。幼苗生長勢試驗除了 93 年第一期作轉殖植酸酵素基因水稻在 25℃下的根長度爲 6.26 cm 低於台農 67 號的 8.97 cm，且達顯著水準外，其餘水稻幼苗性狀表現結果均未達顯著水準。轉殖植酸酵素基因水稻之發芽率及幼苗生長勢與台農 67 號差異不顯著，且後代生殖率顯著較低 (單位面積稻穀產量)，其轉殖之基因亦不具抗除草劑之能力，推論其演變成有害植物之可能性與台農 67 號沒有差異。

關鍵詞：水稻、基因轉殖作物、植酸酵素基因、農藝性狀。

前　言

自古以來人類就不斷對農作物進行品種改良，以獲取最大經濟效益。隨著基因轉殖技術日漸成熟，近年來應用基因轉殖技術所培育出之基因轉殖作物，其種類及栽培面積逐年上升。根據 International Service for the Acquisition Agri-Biotech Application 統計 (James 2007)，全球基因轉殖作物商業栽培面積在 2007 年已達到 11,430 萬 ha，較 1996 年的 170 萬 ha 增加 67 倍，其增長速度可謂極爲快速，成爲近代歷史上發展最快的作物生產技術，基因轉殖作物產業化已成爲不可阻擋的態勢。

---

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2325 號。接受日期：97 年 8 月 1 日。
2. 本所生物技術組助理研究員、研究員兼組長、客座研究員。台灣　台中縣　霧峰鄉。
3. 本所作物組副研究員、副研究員。台灣 台中縣 霧峰鄉。
4. 通訊作者，電子郵件：cgchern @wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04)23339544。

基因轉殖作物帶來可觀的經濟效益和社會效益，同時也存在潛在的環境和食用安全風險。人們對於異於傳統育種方法而產生的基因轉殖作物釋入環境後到底會發生什麼問題充滿疑慮。基因轉殖作物對生態環境影響的安全性評估主要從三個方向加以考量。第一、基因轉殖作物演變成有害植物之可能性。目前商業化之基因轉殖作物，主要改良性狀包括抗病、抗蟲、耐除草劑、延遲老化及軟化、營養成分改變等等。基因轉殖作物在獲得這些新的基因後，其生存競爭力有可能會改變。如果其生長勢、田間自然競爭力、越冬能力或種子產量等方面比非基因轉殖植株強許多，就可能會演化成雜草，進而改變自然的生物種群，打破生態平衡。第二、基因轉殖作物其基因流佈 (gene flow) 到近緣野生種的可能。即在自然生態條件下，有些作物會和周圍生長的近緣野生種發生天然雜交，從而將自身所帶的外源基因轉入野生種。如果所轉殖的是一個耐除草劑基因，就會使野生雜草獲得抗性，增加了雜草控制的難度，特別是多個抗除草劑基因同時轉入一個野生種時，將會帶來無法預期的後果。第三、對自然生物族群的影響。通常所轉殖的基因大都與抗病或抗蟲有關，對標的或非標的生物皆可能造成影響，如大面積和長時期使用，將可能破壞生態平衡及生物多樣性。

水稻是世界上最重要的糧食作物之一，全球有 50%以上的人口以稻米為主要糧食，在台灣水稻的栽培面積達 26 萬 ha (2005–2006 年平均)，是種植面積最廣的作物，過去數十年利用傳統育種方式已培育出許多優良的水稻品種，近年來利用基因轉殖技術培育而成的基因轉殖水稻越來越多，包括轉殖植酸酵素 (phytase) 水稻、轉殖澱粉普魯楠糖 (amylopullulanase) 水稻及轉殖豬乳鐵蛋白 (lactoferrin) 水稻，未來將會有更多的基因轉殖水稻育成。為防範基因轉殖植物可能對生態環境造成衝擊，政府於 2002 年著手進行修正植物品種及種苗法，並於 2004 年公告規定凡由國外引進或國內培育之基因轉殖植物，應申請辦理隔離田間觀察試驗，經審議核准後方得於田間栽培。本研究目的在評估轉殖植酸酵素基因水稻大規模商業化種植之前，進行田間生物安全評估試驗，以確保在自然環境中，對目前已有農作物耕種及環境無不良影響。

材料與方法

試驗地點及其環境設施管理

本試驗實施地點為農委會農業試驗所之「基因轉移植物隔離試驗田」園區內實施。該園區之設立符合農委會公告之「基因轉移植物田間試驗管理規範」之規定，設有基因轉殖作物試驗觀察專用之試驗田、網室、灌溉與道路系統等設施。整個園區共約 5 ha，形成完整而獨立之區域，四周有鐵網和綠籬與外界嚴密隔離，並嚴格管制人員、材料及之進出。試驗後之材料與器具均在園區內就地銷毀或消毒。

供試材料

由國際基因公司提供之轉殖植酸酵素基因水稻品系 (以下簡稱 AAN)，與其受體品種台農 67 號 (實際轉殖之受體株系) 為對照 (以下簡稱 TNG 67)，於 2003 年 8–12 月及 2004 年 2–6 月連續種植二期作。試驗田區採逢機完全區集設計，三重複，多本植，每小區種植 20 行，每行種植 50 株，行株距為 28 × 16 cm。每公頃 N、P_2O_5、K_2O 施用量分別為 120、72 及 48 kg，硫酸銨為氮肥 (N) 的來源，過磷酸鈣及氯化鉀分別為磷肥 (P_2O_5) 及鉀肥 (K_2O) 的來源，田間管理依一般慣行法進行。

生物安全評估調查項目

農藝性狀調查：試驗材料於生育期間，調查各小區之株高、分蘗數及抽穗期，其他性狀於收穫調製後進行。各性狀參照國際稻米研究所 (IRRI, 1996) 訂定之標準或作部份之修改進行調查，說

明如下：株高 (plant height, cm)：測量成熟時稻株主莖地上部之高度。抽穗期 (heading days，天)：每株自移植日起至第一穗抽穗止之日數爲生育日數。穗長 (panicle length, cm)：測量每一株中各穗由穗頸至穗尖的長度，取平均值。穗重 (panicle weight, g)：測量單株所有穗數的總重量，除以穗數。容重 (g/L)：測量每公升稻穀之重量。脫粒率 (% of shattering)：就調查穗長之材料，每次取稻穗 4 穗，置於長 100 cm，寬 30 cm，且一邊高爲 8 cm 之斜木板 2/3 處，再以 1.3 kg 重，25 cm 長之圓筒鐵棒，自上端滾下三次，計算脫粒種子與全部種子數目之比率。

產量構成要素性狀調查：穗數 (panicle numbers)：調查每一單株可抽穗之穗數。每穗粒數 (spikelet no/panicle)：計算各單株中結實粒數與空穎粒數，合計爲總粒數，再除以穗數。稔實率 (spikelet fertility, %)：計算各單株中結實粒數與空穎粒數，合計爲總粒數，再計算結實粒數與總粒數的比率。千粒重 (1000-grain weight, g)：測量結實粒數，除以結實粒數，再換算成 1,000 粒重。公頃產量 (grain yield, kg/ha)：100 株水稻穀粒經脫粒烘乾調整水分含量至 13%，並風選後所得穀粒重換算成每公頃之穀粒重量。

演變成有害植物 (如雜草等) 可能性之評估

種子發芽勢與發芽率試驗：利用紙上法將隨機取得之 100 粒種子置於內鋪一層濾紙之 5 cm 培養皿中，加蒸餾水 5 c.c.至濕潤程度，分別置於 15℃、25℃、35℃、設定光照時間爲 12 hrs 的生長箱內。每處理四重複、每天調查記錄一次發芽率，當樣品在發芽後期連續達 3 天以上無發芽時，即停止記錄。試驗結束後依據 Ellis & Roberts (1981) 方法分別計算最終發芽率 (final germination percentage, %) 及平均發芽時間 (mean germination time, 天)。平均發芽時間 $= \Sigma fd/N$，式中 f 表示種子從播種試驗開始第 d 天發芽幼苗數，d 爲播種後的天數，N 爲至試驗結束止之總發芽數。

幼苗生長勢試驗：水稻種子浸種 3 天後，將已發芽之種子以 0.5 cm 之距離播種於濕潤的吸水紙上，吸水紙係附著在同等大小的壓克力板上，所有種子胚部均保持在同一水平線上，並以吸水紙覆蓋以固定種子，然後將每一片以 67º 的水平仰角斜插在固定架上，固定架上的每一片距離爲 2 cm，每一個固定架放 10 片，其中最前面一片不播種子。然後將固定架置於 30 × 22 × 6 (cm) 的塑膠盆內。塑膠盆內加水至一定高度 (水深 3 cm)，使吸水紙一直維持濕潤狀態。將塑膠盆置於三種不同溫度 (15℃、25℃、35℃) 設定光照時間爲 12 hrs 的生長箱內，每處理三重複、10 天後調查幼苗高度、根長度、幼苗乾重及根乾重。幼苗高度 (seedling height, cm)：測量自種子至葉尖的長度。根長度 (root length, cm)：測量自種子至根尖的長度。幼苗乾重 (seedling dry weight, mg)：將地上部取出，經 45℃、72 hrs 烘乾後，測量其重量。根乾重 (root dry weight, mg)：將地下部取出，經 45℃、72 hrs 烘乾後，測量其重量。

幼苗生長競爭能力之評估：將 AAN 轉殖系與 TNG 67 水稻種子浸種 3 天後，將已發芽之種子相臨種植，株距 2 cm，兩方彼此包圍，比較兩者競爭力的差異。每處理三重複、14 天後調查幼苗高度、根長度、幼苗乾重及根乾重。

結　果

農藝性狀及產量性狀之評估

進行爲期一年二期作的農藝及產量性狀評估，由表 1 結果顯示，92 年第二期作 AAN 轉殖系水稻其株高、分蘗數、穗長、穗重及脫粒率低於對照 TNG 67，其中株高、穗長及穗重有達顯著水準。

另外 AAN 轉殖系容重爲 537.8 g 高於 TNG 67 的 522.3 g 且達到顯著差異。同樣地在 93 年第一期作農藝性狀評估結果顯示，AAN 轉殖系水稻其株高、分蘗數、抽穗期、穗長、穗重、容重及脫粒率均低於對照品種 TNG 67，其中只有穗重達到顯著水準。在產量構成要素性狀方面，由表 2 結果顯示，92 年第二期作 AAN 轉殖系其穗數及每穗粒數低於 TNG 67，千粒重及稔實率則高於 TNG 67，AAN 轉殖系每公頃產量爲 4,585.6 kg，低於 TNG 67 的 7,533.6 kg，且二者之間達顯著水準。而在 93 年第一期作產量構成要素性狀評估中，AAN 轉殖系其穗數、每穗粒數及稔實率均低於 TNG 67，AAN 轉殖系每公頃產量爲 4,630.3 kg，亦低於 TNG 67 的 6,546.3 kg，同樣地達顯著水準。

演變成有害植物（如雜草等）可能性之評估

種子發芽勢與發芽率試驗結果：由表 3 結果顯示，92 年第二期作與 93 年第一期作 AAN 轉殖系與對照品種 TNG 67 在 15℃、25℃及 35℃下之發芽率均達 90%以上，其中 92 年第二期作在 15℃時 AAN 轉殖系發芽率達 95.5%，高於 TNG 67 的 90.5%，二者之間有顯著的差異。種子平均發芽時間無論是 AAN 轉殖系或 TNG 67 一般呈溫度升高而縮短發芽天數之趨勢，顯示低溫可延緩水稻種子發芽。無論是在 15℃、25℃或 35℃，AAN 轉殖系平均發芽時間均高於 TNG 67，且在 15℃達顯著差異，顯示 TNG 67 種子活力高於 AAN 轉殖系。AAN 轉殖系在 15℃時平均發芽時間爲 6.8 天，25℃時降爲 3.1 天，至 35℃時發芽時間則縮短爲 2.6 天。對照品種 TNG 67 在 15℃、25℃及 35℃之平均發芽時間分別爲 6.1、3.0 及 2.6 天。

幼苗生長勢試驗：表 4 爲 92 年第二期作及 93 年第一期作 AAN 轉殖系與其受體品種 TNG 67 在 15℃、25℃及 35℃下水稻幼苗性狀之表現結果，主要評估水稻幼苗在遭受溫度逆境下的忍受能力。由結果顯示，除了在 15℃下 AAN 轉殖系的莖乾重高於 TNG 67 外，其餘在 15℃、25℃及 35℃下轉殖水稻的莖長度、根長度及根乾重等性狀皆低於 TNG 67。另外除了 93 年第一期作 AAN 在 25℃下的根長度爲 6.26 cm 低於 TNG 67 的 8.97 cm，且達顯著水準外，其餘水稻幼苗性狀表現結果均未達顯著水準。

幼苗生長競爭能力之評估：由表 5 結果顯示，92 年第二期作 AAN 轉殖系的鬚根數及根部乾重高於 TNG 67，而莖長度、根長度及莖乾重則低於 TNG 67，但其差異均未達顯著水準。93 年第一期作 AAN 轉殖系的鬚根數爲 4.04 支，低於 TNG 67 的 5.06 支，二者達顯著水準。而 AAN 轉殖系的根長度及根部乾重均高於 TNG 67，同樣地亦達顯著水準。地上部的莖長度及莖部乾重則未達顯著水準。

討　論

基因轉殖作物農藝性狀表現的好壞，一直是育種家非常關心的問題，也是決定基因轉殖作物能否直接應用的關鍵之一。經由一年二期作的試驗得知，AAN 轉殖系水稻的農藝性狀及產量性狀 (表 1、2) 與原受體品種 TNG 67 相比，普遍表現較差。除千粒重高於 TNG 67 外，其餘生育表現皆略遜於 TNG 67。此與許多研究報告結果相似，外源基因的插入，不可避免引起一些性狀的變異。Cui *et al.* (1998) 研究基因轉殖水稻在一般試驗田生長的條件下，其株高、穗長、單株產量和千粒重皆明顯比受體品種低。He *et al.* (2002) 對多個基因轉殖水稻後代的觀察顯示基因轉殖水稻植株的主要農藝性狀都發生了一定的變異，其變化方向和幅度並不確定，在同一品種的不同轉殖株系或同一品種的同一轉殖株系中農藝性狀變化均可能是相同或相異的。Lynch *et al.* (1995) 於田間及溫室觀察 R_2 世代的基因轉殖水稻發現其植株變小、花期延遲、稔實率降低等現象，對於導致基因轉殖水稻

後代農藝性狀變化的原因，作者推測可能是外源基因的插入造成或是在轉殖過程中的組織培養階段產生的變異，而轉殖基因的表達亦可能導致轉殖株農藝性狀改變。

檢測轉殖水稻種子發芽率能近似地反映出苗率，平均發芽時間則爲種子活力之表現因子，因此，檢測發芽率及平均發芽時間是評估基因轉殖水稻變成有害植物之重要指標。因此，種子在萌發過程中各種酶及種胚活性物質的代謝作用均會受溫度所影響。溫度是影響種子發芽的主要因素之一。由表 3 之結果顯示，AAN 轉殖系與 TNG 67 在 15℃、25℃及 35℃下之最終發芽率均達 90%以上，其發芽率並未受到影響，但平均發芽時間在 15℃下 AAN 轉殖系和 TNG 67 都受到抑制，且達顯著差異，顯示在 15℃AAN 轉殖系的種子活力明顯低於對照品種 TNG 67。其變成有害植物可能性之風險低於 TNG 67。幼苗生長勢試驗中無論是 AAN 轉殖系或 TNG 67 其莖長度、根長度、莖乾重及根乾重均受低溫處理所抑制，除了在 15℃下，AAN 轉殖系的莖乾重高於 TNG 67 外，其餘性狀皆低於 TNG 67 (表 4)，顯示 AAN 轉殖系植株根系活力低於 TNG 67，使其在低溫生長受到抑制。在幼苗生長競爭能力之評估試驗中 (表 5)，AAN 轉殖系平均幼苗乾重及根乾重明顯高於 TNG 67，顯示若在同一生長環境下 AAN 轉殖系競爭能力高於 TNG 67。

基因轉殖水稻演變成有害植物風險因子主要爲水稻作物本身及自然雜交後代，Hancock & Hokanson (2001) 認爲基因轉殖植物多半僅改變已熟知植物之單一或少數基因，故基因轉殖植物之環境影響評估遠較入侵種者爲單純且可靠。Chiang & Yuan (2005) 亦認爲基因轉殖植物大多僅涉

表 1. 92 年第二期作與 93 年第一期作植酸酵素基因轉殖系與對照品種農藝性狀之評估

Table 1. Evaluation of agronomic traits of AAN (phytase-transgenic) and TNG 67 (non-transgenic) rice in two crop seasons

Planting season	Variety	Plant height (cm)	Tillering no. (plant)	Heading days (days)	Panicle length (cm)	Panicle weight (g)	Grain volume weight (g/L)	Grain shattering percentage (%)
92II	AAN	95.4 b [z]	12.6 a	73.7 a	18.0 b	2.0 b	537.8 a	37.3 a
(2003)	TNG67	104.3 a	12.7 a	73.3 a	19.5 a	2.2 a	522.3 b	43.0 a
93I	AAN	86.6 a	11.7 a	83.7 a	17.6 a	2.2 b	550.1 a	10.7 a
(2004)	TNG67	97.6 a	13.9 a	85.0 a	17.9 a	2.5 a	550.7 a	19.7 a

[z] Means within each column followed by the same letter are not significantly different ($P > 5\%$) according to LSD test.

表 2. 92 年第二期作與 93 年第一期作植酸酵素基因轉殖系與對照品種產量性狀之評估

Table 2. Seed yield and yield components of AAN (phytase-transgenic) and TNG 67 (non-transgenic) rice in two crop seasons

Planting Season	Variety	Panicle Number (no.)	Spikelet/ panicle (no.)	1000-grain weight (g)	Seed set (%)	Yield (kg/ha)
92II	AAN	12.0 a [z]	88.6 b	25.3 a	78.1 a	4585.6 b
(2003)	TNG67	12.6 a	109.8 a	23.6 a	72.7 b	7533.6 a
93I	AAN	12.3 a	80.3 b	28.1 a	87.0 a	4630.3 b
(2004)	TNG67	13.1 a	103.1 a	26.2 b	87.4 a	6546.3 a

[z] Means within each column followed by the same letter are not significantly different ($P > 5\%$) according to LSD test.

表 3. 92 年第二期作與 93 年第一期作植酸酵素基因轉殖系與對照品種在 15℃、25℃及 35℃下種子發芽之評估

Table 3. Comparison of seed germination of AAN (phytase-transgenic) and TNG 67 (non-transgenic) rice at 15℃, 25℃ and 35℃ harvested in two crop seasons

Planting season	Variety	Final germination percentage (%)	Mean germination time (days)
92II			
15℃	AAN	95.5 a [z]	7.0 a
	TNG 67	90.5 b	6.4 b
25℃	AAN	93.8 a	3.6 a
	TNG 67	93.8 a	3.3 a
35℃	AAN	94.8 a	3.2 a
	TNG 67	95.0 a	3.1 a
93I			
15℃	AAN	94.0 a	6.6 a
	TNG 67	94.3 a	5.8 b
25℃	AAN	95.8 a	2.5 a
	TNG 67	94.5 a	2.6 a
35℃	AAN	94.8 a	2.1 a
	TNG 67	96.3 a	2.2 a

[z] Means within each column followed by the same letter are not significantly different (P > 5%) according to LSD test.

表 4. 92 年第二期作與 93 年第一期作植酸酵素基因轉殖系與對照品種在 15℃、25℃及 35℃下水稻幼苗性狀之表現

Table 4. Comparison of seedling traits of AAN (phytase-transgenic) and TNG 67 (non-transgenic) rice grown at 15℃, 25℃ and 35℃ in two crop seasons

Planting season	Variety	Seedling height (cm)	Root length (cm)	Seedling dry weight (mg)	Root dry weight (mg)
92II					
15℃	AAN	1.73 a [z]	4.00 a	1.37 a	0.80 a
	TNG 67	2.00 a	4.23 a	1.30 a	0.87 a
25℃	AAN	11.67 a	13.07 a	6.97 a	2.73 a
	TNG 67	11.73 a	13.72 a	7.63 a	3.72 a
35℃	AAN	11.32 a	12.48 a	7.13 a	2.10 a
	TNG 67	13.27 a	17.12 a	8.13 a	2.50 a
93I					
15℃	AAN	1.52 a	2.99 a	1.53 a	0.88 a
	TNG 67	1.65 a	3.24 a	1.12 a	1.04 a
25℃	AAN	3.62 a	6.26 b	2.66 a	1.43 a
	TNG 67	3.96 a	8.97 a	2.89 a	3.31 a
35℃	AAN	7.58 a	13.38 a	5.58 a	3.50 a
	TNG 67	8.54 a	15.31 a	6.21 a	4.40 a

[z] Means within each column followed by the same letter are not significantly different (P > 5%) according to LSD test.

及單一或少數基因之改變，其對環境可能影響遠低於可將全部基因引入環境之外來入侵植物，且台灣目前研發之基因轉殖植物多屬高度馴化或野生力弱之種類，與外來入侵植物相較之下，基因轉殖植物之雜草風險即顯得微不足道。本項評估 AAN 轉殖系雜草化試驗項目，已進行種子生產量、不同溫度下種子最終發芽率與平均發芽時間、室內不同溫控下之幼苗生長勢及田間環境下之幼苗生長勢比較，目前所得數據未顯示基因轉殖系 AAN 有較強之雜草化趨勢。

表 5. 92 年第二期作與 93 年第一期作植酸酵素基因轉殖系與對照品種移植 14 天後之幼苗性狀

Table 5. Comparison of seedling traits of AAN (phytase-transgenic) and TNG 67 (non-transgenic) rice after 14 days transplanted in two crop seasons

Planting season	Variety	Fibrous root no.	Seedling height (cm)	Root length (cm)	Seedling dry weight (mg)	Root dry weight (mg)
92II	AAN	4.22 a [z]	12.46 a	7.99 a	8.26 a	1.97 a
	TNG 67	3.25 a	13.70 a	8.66 a	8.27 a	1.75 a
93I	AAN	4.04 b	13.28 a	11.40 a	10.27 a	2.24 a
	TNG 67	5.06 a	13.44 a	8.79 b	9.88 a	1.94 b

[z] Means within each column followed by the same letter are not significantly different (P > 5%) according to LSD test.

引用文獻 (Literature cited)

Chiang, M. Y. and C. I. Yuan. 2005. Weed risk of transgenic plants: Research and assessment. p.65–85. *in* the Proceeding of Symposium on Biosafety Assessment of Transgenic Plants. Agric. Res. Inst. Pub. No.120. 226 pp. (in Chinese with English abstract)

James, C. 2007. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2007. ISAAA Briefs 37. ISAAA: Ithaca, NY.

Cui, H. R., Q. Y. Shu, and Y. B. Xiang. 1998. Field performances of transgenic rice with a cry1 Ab gene. p.810–815. *in*: Eploration and Investigation on Life Sciences. (Zhu, M. Y. and Y. N. Li, eds.) Hangzhou Univ., Hangzhou. 815 pp.

Ellis, R. H. and E. H. Roberts. 1981. The quantification of aging and survival in orthodox seeds. Seed Sci. Technol. 9:373–409.

Hancock, J. E. and L. E. Hokanson. 2001. Invasiveness of transgenic vs. exotic plant species: How useful is the analogy ? p.187–192. *in* the Proceeding of the First International Symposium on Ecological and Societal Aspects of Transgenic Plantations. College of Forestry, Oregon State Univ. 238 pp.

He, L. F., S. Q. Wei, and S. A. Lu. 2002. Studies on the variations of agronomic characteristic from rice transformed with SCK gene progeny. J. Guangxi Agric. Biol. Sci. 21:73–77. (in Chinese)

IRRI. 1996. Standard Evaluation System for Rice. IRRI press, Los Banos, Laguna, Philippines. 52 pp.

Lynch, P. T., J. Jones, and N. W. Blackhall. 1995. The phenotypic characterization of R_2 generation transgenic rice plants under field and glasshouse conditions. Euphytica 85:395–401.

Field Assessment of Agronomic Performance and Biosafety of Phytase-gene Transformed Rice [1]

Ching-Shan Tseng[2], Min-Tze Wu[2], Hung-Chang Huang[2], Ming-Hsing Lai[3], and Chyr-Guan Chern[3,4]

Abstract

Tseng, C. S., M. T. Wu, H. C. Huang, M. H. Lai, and C. G. Chern. 2008. Field assessment of agronomic performance and biosafety of phytase-gene transformed rice. J. Taiwan Agric. Res. 57:175–182.

A field study was conducted to assess performance and biosafety of the phytase-gene transformed rice (*Oryza sativa* L.), strain AAN, originated from the cultivar Tainung 67. Seedlings of phytase-transgenic and non-transgenic (control) rice were transplanted into an isolation field at the Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan, and compared for plant growth and yield. There were two experiments in this study with the first experiment was carried out during the second crop season, from August to December, 2003 and the second experiment was carried out during the first crop season, from February to June, 2004. Results showed that plant height, panicle length, panicle weight and seed yield of phytase-transgenic rice were significantly lower ($P < 0.05$) than those of non-transgenic rice. Compared to the temperatures of 25℃ and 30℃, seed germination rate and germination speed were reduced in both transgenic and non-transgenic rice under the temperature of 15℃. However, compared to the non-trangenic rice at 15℃, seeds of phytase-transgenic rice had a significantly lower rate of germination but a significantly higher speed of germination. There was no significant difference ($P > 0.05$) in growth vigor of rice seedlings between phytase-transgenic and non-transgenic plants except for root length which was shorter in transgenic plants (6.5 cm) but longer in non-trangenic plants (8.97 cm) for the test at 25℃ in the experiment of Spring of 2004.

Key words: Rice, Genetically modified crops, Phytase-gene, Agronomic traits.

---

1. Contribution No.2325 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: August 1, 2008.
2. Respectively, Assistant researcher , Researcher and Head, Visiting scientist, Biotechnology Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Associate researcher, Associate researcher, Crop Science Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
4. Corresponding author, e-mail: cgchern@wufeng.tari.gov.tw; Fax: (04)23339544.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 57(3):183–192 (2008)

台灣金線連生技產品之毒理安全性評估

I. 台灣金圓酒對大鼠之口服急毒性試驗 [1]

蕭翌柱[2] 廖俊旺[3] 吳明哲[2,4]

摘 要

蕭翌柱、廖俊旺、吳明哲。2008。台灣金線連生技產品之毒理安全性評估 I. 台灣金圓酒對大鼠之口服急毒性試驗。台灣農業研究 57:183–192。

台灣金線連萃取物已知具有保肝、鎮痛、利尿、降血糖及降血壓等作用，唯以其萃取物為主要成分，或是配伍其他原料製成如「台灣金圓酒」之類的保健飲品，在上市販售前仍應進行對哺乳動物之安全性評估。本研究係依據安全性評估規範進行台灣金圓酒對大鼠 (SD 品系) 之口服急毒性試驗。供試酒樣品先以逆滲透水配製成溶液濃度，依體重最終經口投予大鼠的劑量總計為 5 g/kg，投予後連續觀察 14 天。結果全部鼠隻無中毒症狀或死亡，故其對大鼠之口服急毒性 LD_{50} 值應大於 5 g/kg；另外，調查處理組雄、雌鼠第 0、7 及 14 天時體重及增重並無影響。檢查白血球及紅血球總數、血紅素、血球容積比、平均紅血球體積、平均血紅素及平均血紅素濃度、血小板及白血球分類等血液值均無與試驗物質有關之影響。血清肝腎酵素值天門冬酸轉氨酶 (AST)、氨基丙酸轉氨酶 (ALT)、尿素氮 (BUN) 及肌氨酸 (creatinine) 等項目亦無與試驗物質有關之影響。檢視體內臟器重量包括腦、心、肝臟、腎臟、脾臟、胸腺、腎上腺、睪丸及卵巢及等重量及百分比與對照組比較皆無明顯差異，切片鏡檢體內重要臟器均無因試驗物質引起之肉眼及組織病理變化。由本試驗結果推論，每日以 5 g/kg 體重的台灣金圓酒劑量，經口持續餵食大鼠 14 日後，應未產生毒害作用。

關鍵詞：口服急毒性試驗、台灣金線連、草藥、大鼠、安全性評估。

前 言

約自 90 年代開始，歐、美、日等先進國家在維護其人民衛生與健康的政策上，已逐步由原本的治療醫學模式轉而重視預防及保健醫學，此正與中國傳統醫學一再強調的「攝生以治未病」觀念

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2326 號。接受日期：97 年 8 月 8 日。
2. 本所生物技術組助理研究員、研究員兼組長。台灣 台中縣。
3. 國立中興大學獸醫病理生物學研究所副教授。台灣 台中市。
4. 通訊作者，電子郵件：wu@wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04)23302806。

不謀而合。有鑑於我國在藥用保健植物的採擷利用已累積有數千年以上的歷史，且對於藥材性味、配伍、歸經或炮製加工等知識多有闡述和記載，因此，中醫藥產業的進展和天然植物有效成分之開發利用也受到國際殷切的期盼並積極參與研究。例如，德國製藥廠即自中國進口大量銀杏葉原料，經萃取分離出銀杏苷等物質再製成高價保健產品行銷世界；日本也運用大型發酵設備，量產具有廣譜抑菌、清熱與解毒功效的紫草醌及小檗鹼 (黃連素) 等珍貴藥用成分；近年來，為配合世界衛生組織 (WHO) 全球治瘧需求，中國大陸更由古醫學典籍中篩選出抗瘧植物－青蒿，再配合生物反應器等現代設備探討青蒿素之量產技術 (Liu *et al*. 1999)。

台灣整體經濟及生活水準已達到開發國家之列，社會大眾對於日常保健使用的中草藥製品接受度頗高，其中即包含以台灣金線連 (*Anoectochilus formosanus* Hayata) 為主要原料研製而成的茶包及飲品。台灣金線連是我國中、高海拔山區珍貴的原生植物，在分類學上屬於蘭科多年生地生蘭類，耆老們相傳其極具保健功效，故另有藥王、藥虎、鳥人蔘和雉雞草等別名。國內、外學者曾在台灣金線連全植株中以甲醇、乙醇水溶液或純水為主要溶劑，萃取分離出金線連醣苷 (kinsenoside)、金線連酮 (kincenone) 及天麻素 (gastrodin) 等有用成分，且測試其抗氧化能力足以媲美銀杏葉和兒茶素 (Du *et al*. 1998; Wang *et al.* 2002; Tzeng 2005)；藥理研究顯示金線連醣苷對於減低體內過多脂肪及肝臟內三酸甘油脂 (triglyceride) 含量有明顯促進作用 (Du *et al*. 2001)；金線連水萃液對於四氯化碳 (CCl_4) 所誘發的動物肝毒性，也具有良好的保肝效果 (Lin *et al.* 1993)，並有明顯的鎮痛、降血糖、利尿及降血壓等作用 (Liang *et al.* 1990)；此外，學者發現金線連全草以純水煮沸萃取獲得之樣本溶液，對於花生四烯酸 (arachidonic acid) 的新陳代謝具有相當的生理活性，可能在治療心臟血管疾病方面具有良好的功效 (Huang *et al.* 1991; Mak *et al.* 1990)。

台灣金線連不但在藥效和藥理方面已獲得初步驗證，不同品種之特性比較也已完成，甚至於以 5 g/kg 最高限劑量的金線連全草水萃液餵食白鼠之急毒性試驗，在試驗期滿後並未被檢出臨床症狀 (Liu *et al.* 1998)。但是，以其萃取物為主成分並調配其他原物料所研製的生技保健食品，在上市販售前仍應進行對哺乳動物之安全性評估，藉以建立產品安全資料。因此，本文主要目標，即在進行農業試驗所研發之台灣金線連養生酒製品 (品名：台灣金圓酒) 對於大鼠口服急毒性試驗，若能通過嚴格測試和安全評估，未來在此類產品進行技術移轉及量產之後，或能提供國人另一項養生保健產品的新選擇。

材料與方法

試驗規範

依據衛生署健康食品安全性評估-口服急毒性試驗規範，並符合美國環保署 (USEPA) (*Health Effects Test Guidelines*, OPPTS 870.1100, *Acute oral toxicity*, US EPA 712-C-98-190. *In*: OPPTS *Harmonized Test Guidelines*, Series 870.3050, EPA712-C-00-366) 及經濟合作暨開發組織 (*OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.* Section 4: Health Effects. *No. 420: Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure, No. 423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method, No. 425: Acute Oral Toxicity-Up and Down Method*) 等試驗規範進行口服急毒性試驗；實驗動物之使用規範則依據中華實驗動物學會之「實驗動物管理與使用指南」進行操作 (Yu *et al.* 2005)。

供試酒樣品

「台灣金圓酒」外觀呈黃棕色，主要原料是由台灣金線連全草以 58%乙醇萃取溶液並添加定量的桂圓等果品浸膏，以一定的比例調和台農 71 號香米酒 (酒精濃度 58%，杏花村酒坊出品) 和純水，製成含酒精濃度 52%之供試酒樣品且儲存於室溫環境，試驗時以逆滲透水稀釋及配製。

供試動物

四週齡大鼠 (SD 品系) 購自樂斯科生技園區實驗動物培育及研發中心 (宜蘭，台灣)，動物房溫度爲 20–22℃及 12 hrs 光/12 hrs 暗之光照週期。另購置鼠專用粒狀飼料 (LabDiet® 5001 Rodent diet, Purina Mills LLC, St. Louis, MO, USA) 作爲正常飼料，並以逆滲透水供其飲用，經 1 週適應期後進行試驗。

口服急毒性試驗

口服急毒性試驗分爲 5 g/kg 體重劑量組及對照組，每組 10 隻大鼠 (雌雄各半)，編號以飽和苦味酸染劑於背部作標識。試驗樣品純度視爲 100%，以逆滲透水配置酒樣品之試驗濃度爲 0.5 g/mL。試驗時，取不鏽鋼胃管，依大鼠體重經口餵食投予體積量爲 10 mL/kg，處理後每日觀察並每週稱體重 1 次，至處理後第 14 天止。試驗結束時，大鼠以 2%異氟醚 (Isoflurane) (Halocarbon Laboratories, South Carolina, USA) 氣體麻醉後，經腹主動脈採血並達完全放血後犧牲，進行大體解剖，檢查體內臟器之肉眼及組織病理變化。

血液學檢查

口服急毒性試驗結束後，自麻醉的大鼠腹主動脈採集全血，放入含 EDTA 抗凝血劑試管 (K3 EDTA syringes, Vacutainer, NJ, USA)，於血球計數儀 (Sysmex K-4500, Toa Medical Electronics Co., Ltd., Kobe, Japan) 檢測血液相，包括紅血球數 (red blood cell count, RBC count)、血紅素 (hemoglobin, HGB)、血球容積比 (hematocrit, Hct)、平均紅血球體積 (mean corpuscular volume, MCV)、平均血球血色素 (mean corpuscular hemoglobin, MCH)、平均血球血色素濃度 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC) 及血小板 (platelet) 等項目。白血球分類 (differential leukocyte count) 則先以血液抹片，經 Weigert's Iron Hematoxylin Stain Kit (A. J. P. Scientific Inc., NJ. USA) 染色後，於光學顯微鏡 400 倍下，計算白血球中淋巴球 (lymph)、嗜中性球 (neutrophil)、單核球 (monocyte)、嗜酸性球 (eosinophil) 及嗜鹼性球 (basophil) 之百分率。

血清生化檢查

自麻醉的大鼠腹主動脈採集全血，放入離心機 (Kubota 2010, Tokyo, Japan) 以轉速 3,000 rpm (離心力 3,230 xg) 離心 15 mins，取上清液血漿，以血清生化儀 (Chiron Diagnostics Corporation, Oberlin, OH, USA) 檢測血清肝腎酵素值，包括天門冬酸轉氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、氨基丙酸轉氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、肌氨酸 (creatinine) 等項目。

臟器病理檢查

大鼠經麻醉及放血犧牲後進行解剖，秤腦、心、肝、腎、脾、胸腺、腎上腺，睪丸及卵巢等臟器重量，並以最後一週之最終體重作爲體內臟器重量比之計算基準。在觀察肉眼病理變化方面，先取臟器浸泡於 10%中性福馬林溶液中固定 1 週，經組織粗修與石臘包埋，再以石臘組織切片機

(Leica RM 2145, Nussloch, Germany) 製成 2 μm 厚度之組織切片，經 Hematoxylin & Eosin (H & E) 染色後，於光學顯微鏡觀察組織病理變化。另依 Shackelford 等人 (2002) 發展之方法進行組織病理變化描述及病理評估，標準計分 5 個等級：1 = minimal (< 1%); 2 = slight (1–25%); 3 = moderate (26–50%); 4 = moderate/severe (51–75%); 5 = severe/high (76–100%)。

結果分析

試驗結束後，若處理組動物死亡數超過處理動物數半數 (50%)，以 Probit analysis 分析求取藥劑量與死亡率之迴歸方程式，以取得動物半數致死劑量 (LD_{50})。另外，試驗期間獲得的各項數值則分別計算其算術平均值及標準偏差 (Standard Deviation, SD) 並採用單因子變異數分析 (one-way analysis of variance) 及進行 Dunnet's t-test ($p < 0.05$)，以檢定對照組與處理組之間的差異。

結 果

口服急毒性試驗

表 1 結果顯示，供試樣品經口服投予大鼠並完成階段實驗後，全部鼠隻未有中毒症狀或死亡的情形發生；另外，供試對照組與處理組之雄鼠在第 7 天時之增重百分比分別爲 46.2 ± 2.2% 及 41.7 ± 1.3%，處理組雄鼠之增重百分比明顯低於對照組，但在第 14 天時測量其平均體重則分別爲 290.6 ± 8.5 g 及 283.4 ± 3.5 g；增重百分比分別爲 69.7 ± 5.3%及 60.8 ± 4.0%，相較結果則已無明顯差異。若以雌鼠爲測試對象，則在第 14 天時，對照組與處理組之平均體重分別爲 212.4 ± 11.1 g 及 205.5 ± 10.2 g，增重百分比爲 43.1 ± 6.6%及 42.0 ± 0.3%，相較結果也無明顯差異。

血液學檢查

檢測供試大鼠之血液相，結果如表 2 所示，當紅血球數以 10^6/μL 爲計算單位時，對照組雄鼠的紅血球數平均爲 6.8 ± 0.2 單位、處理組爲 7.0 ± 0.7 單位，二者未有明顯差異；比較對照組與處理組雌鼠的紅血球數也未見明顯差異 (8.2 ± 1.7 與 6.8 ± 0.5 單位)。對照組雄鼠每 100 mL 血液中的血紅素含量爲 15.3 ± 0.4 g、處理組則爲 15.4 ± 1.5 g；供試雌鼠對照組與處理組的血紅素含量分別爲 18.4 ± 3.4 g 和 15.6 ± 1.0 g。計算血球容積比的數值顯示，對照組雄鼠爲 41.4 ± 1.1%，處理組則

表 1. 餵食台灣金圓酒 14 天後之大鼠體重及增重變化 [z]

Table 1. Body weight and body weight gain of rats after feeding the Taiwan Jin-Yuan wine for 0, 7 and 14 days [z]

Treatment		Days after feeding the Taiwan Jin-Yuan wine				
Sex	Oral dose	0 day	7 day		14 day	
	(g/kg)	MBW (g)	MBW (g)	BWG (%) [y]	MBW (g)	BWG (%)
Male	0 (control)	171.3 ± 2.4	250.5 ± 5.3	46.2 ± 2.2	290.6 ± 8.5	69.7 ± 5.3
	5	176.3 ± 5.1	249.9 ± 6.1	41.7 ± 1.3*	283.4 ± 3.5	60.8 ± 4.0
Female	0 (control)	148.4 ± 5.8	197.7 ± 11.9	33.1 ± 4.4	212.4 ± 11.1	43.1 ± 6.6
	5	147.6 ± 3.2	190.0 ± 5.8	28.7 ± 2.7	205.5 ± 10.2	42.0 ± 0.3

[z] MBW: mean of body weight; BWG: Body weight gain. MBW (g) and BWG (%) are expressed as the mean ± SD (n =5). *$p < 0.05$ compared with control group.

[y] BWG on the 7^{th} day (%) = (7^{th}-0^{th})BW (g) / (0^{th})BW (g) × 100.

為 42.7 ± 5.0%；供試雌鼠對照組的數值為 48.9 ± 10.0%，處理組為 40.5 ± 3.5%。檢測雄鼠和雌鼠平均紅血球體積的結果，則不論是對照組或處理組，供試雄鼠和雌鼠的數值均介於 59.6–60.9 fL，彼此間未有明顯差異。另外，比較雄鼠和雌鼠血液中之平均血球血色素、平均血球血色素濃度及血小板等項目，不論是雄鼠或雌鼠，其對照組與處理組未見明顯差異。

供試大鼠血液經抹片後再染色鏡檢進行白血球分類，結果如表 3 所示，當白血球數以 10^3/μL 為計算單位時，對照組雄鼠的白血球數平均為 9.7 ± 4.5 單位、處理組為 10.7 ± 2.5 單位；另外，計算對照組與處理組雌鼠的白血球總數則分別為 12.4 ± 6.5 和 8.0 ± 3.8 單位，彼此未有明顯差異。若調查白血球中淋巴球所佔的比率，則不論是雄鼠或雌鼠，其對照組與處理組之比率均介於 77.2–84.0%，比較後未有明顯差異。鏡檢嗜中性球的含量顯示，對照組雄鼠為 13.2 ± 4.9%，處理組則為 12.0 ± 5.7%；供試雌鼠對照組的數值為 13.4 ± 7.7%，處理組則為 11.8 ± 2.2%。處理組雄鼠之單核球比例 (4.4 ± 1.6%) 與對照組 (7.4 ± 1.4%) 相較下有稍低情形，但對供試雌鼠而言，則不論是對照組或處理組皆無明顯差異 (5.4 ± 1.7% 與 4.0 ± 1.9%)。本試驗中，鏡檢嗜酸性球及嗜鹼性球的含量皆趨近於 0%。

血清生化檢查

以血清生化儀檢測大鼠血清肝腎酵素值，結果如表 4 所示，對照組雄鼠之天門冬酸轉氨酶每公升含量為 138.1 ± 23.5 國際單位 (U)，處理組則為 127.8 ± 12.1 U；供試雌鼠對照組的數值為 154.6 ± 21.5 U/L，處理組則為 113.9 ± 19.5 U/L，其數值較對照組低。另外，檢測其氨基丙酸轉

表 2. 餵食台灣金圓酒 14 天後之大鼠血液學變化 [z]

Table 2. Changes of hematological parameters of rats after feeding the Taiwan Jin-Yuan wine for 14 days [z]

Treatment		RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT
Sex	Dose (g/kg)	(10^6/μL)	(g/dL)	(%)	(fL)	(pg)	(g/dL)	(10^3/μL)
Male	0 (control)	6.8 ± 0.2	15.3 ± 0.5	41.4 ± 1.1	60.7 ± 1.1	22.4 ± 0.4	36.9 ± 0.5	1039.3 ± 51.6
	5	7.0 ± 0.7	15.4 ± 1.5	42.7 ± 5.0	60.9 ± 1.8	21.9 ± 0.7	36.0 ± 1.3	688.8 ± 509.5
Female	0 (control)	8.2 ± 1.7	18.4 ± 3.4	48.9 ± 10.0	59.8 ± 2.0	22.5 ± 0.5	37.7 ± 1.1	1014.8 ± 208.6
	5	6.8 ± 0.5	15.6 ± 1.0	40.5 ± 3.5	59.6 ± 1.8	22.9 ± 1.0	38.5 ± 1.2	1151.6 ± 127.7

[z] RBC: red blood cell; HGB: hemoglobin; HCT: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; PLT: platelets. Data are expressed as the mean ± SD (n = 5).

表 3. 餵食台灣金圓酒 14 天後之大鼠白血球分類變化 [z]

Table 3. Changes of white blood cells differentiation of rats after feeding the Taiwan Jin-Yuan wine for 14 days [z]

Treatment		WBC	Lymph	Neutrophil	Monocyte	Eosinophil	Basophil
Sex	Dose (g/kg)	(10^3/μL)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Male	0 (control)	9.7 ± 4.5	78.8 ± 4.4	13.2 ± 4.9	7.4 ± 1.4	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4
	5	10.7 ± 2.5	83.6 ± 4.5	12.0 ± 5.7	4.4 ± 1.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Female	0 (control)	12.4 ± 6.5	77.2 ± 8.8	13.4 ± 7.7	5.4 ± 1.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	5	8.0 ± 3.8	84.0 ± 3.8	11.8 ± 2.2	4.0 ± 1.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

[z] WBC: white blood count; Data are expressed as the mean ± SD (n = 5).

氨酶含量之變化，則對照組雄鼠每公升含量為 31.5 ± 4.7 U，處理組則為 28.5 ± 1.2 U；供試雌鼠對照組的數值為 22.9 ± 1.8 U/L，處理組為 20.4 ± 2.7 U/L，比較後未見明顯差異。測定雄鼠尿素氮含量，則對照組每 100 mL 的血清中含有 9.6 ± 1.0 mg，處理組為 8.9 ± 1.7 mg；供試雌鼠對照組與處理組的數值分別為 14.1 ± 2.2 mg/dL 和 14.1 ± 1.5 mg/dL。若檢測肌氨酸含量時，則不論是供試雄鼠或雌鼠，其對照組與處理組之含量均介於 0.4–0.5 mg/dL，比較後未有明顯差異。

臟器病理檢查

比較供試雄鼠及雌鼠體內臟器重量變化的結果如表 5 所示，對照組雄鼠腦部在試驗過程中，發育增加重量的百分比為 0.64 ± 0.03%，處理組為 0.67 ± 0.04%；供試雌鼠對照組的數值為 0.86 ± 0.05%，處理組則為 0.93 ± 0.04%，比較後並無明顯差異。綜觀其餘臟器的重量變化百分比可知，不論是供試雄鼠或雌鼠，對照組與處理組之心臟 (0.33–0.4%)、肝臟 (3.06–3.12%)、腎臟 (0.71–0.75%)、脾臟 (0.19–0.23%)、胸腺 (0.19–0.29%)、腎上腺 (0.02–0.03%)、睪丸 (0.93 ± 0.08 與 0.93 ± 0.06%) 及卵巢 (0.06 ± 0.01 與 0.05 ± 0.01%) 等增重比率，經比較後也無明顯差異；上述各項重要臟器經取出鏡檢，也無因試驗物質引起之肉眼及組織病理變化 (圖 1)。此外，在進行組織病理檢查時，肝臟出現極微至輕微之肝細胞局部散發性變性或壞死，此在對照組雌、雄鼠發生率均為 40%，另口服台灣金圓酒之處理組雄鼠發生率則為 20%，雌鼠則為 40%，據此推估應與試驗物質無關。

表 4. 餵食台灣金圓酒 14 天後之大鼠血清肝及腎臟功能指數變化 [z]

Table 4. Serum biochemistry changes in liver and renal function of rats after feeding the Taiwan Jin-Yuan wine for 14 days [z]

Treatment		AST	ALT	BUN	Creatinine
Sex	Dose (g/kg)	(U/L)	(U/L)	(mg/dL)	(mg/dL)
Male	0 (control)	138.1 ± 23.5	31.5 ± 4.7	9.6 ± 1.0	0.4 ± 0.0
	5	127.8 ± 12.1	28.5 ± 1.2	8.9 ± 1.7	0.5 ± 0.1
Female	0 (control)	154.6 ± 21.5	22.9 ± 1.8	14.1 ± 2.2	0.5 ± 0.0
	5	113.9 ± 19.5	20.4 ± 2.7	14.1 ± 1.5	0.5 ± 0.1

[z] AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; BUN: blood urea nitrogen. Data are expressed as the mean ± SD (n =5).

表 5. 餵食台灣金圓酒 14 天後之大鼠臟器重量變化 [z]

Table 5. Organ weight changes of rats after feeding the Taiwan Jin-Yuan wine for 14 days [z]

Treatment		Brain	Heart	Liver	Kidney	Spleen	Thymus	Adrenal gland	Testies/ovary
Sex	Dose (g/kg)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Male	0 (control)	0.64 ± 0.03 [y]	0.33 ± 0.02	3.08 ± 0.17	0.71 ± 0.04	0.20 ± 0.01	0.19 ± 0.04	0.02 ± 0.01	0.93 ± 0.08
	5	0.67 ± 0.04	0.36 ± 0.02	3.08 ± 0.44	0.75 ± 0.06	0.19 ± 0.03	0.22 ± 0.05	0.02 ± 0.00	0.93 ± 0.06
Female	0 (control)	0.86 ± 0.05	0.40 ± 0.03	3.12 ± 0.28	0.75 ± 0.04	0.20 ± 0.03	0.25 ± 0.06	0.03 ± 0.00	0.06 ± 0.01
	5	0.93 ± 0.04	0.40 ± 0.04	3.06 ± 0.31	0.73 ± 0.07	0.23 ± 0.03	0.29 ± 0.05	0.02 ± 0.00	0.05 ± 0.01

[z] Organ weight (%) = [organ weight (g)/ final body weight (g)] × 100.
[y] Data are expressed as the mean ± SD (n = 5).

討　　論

近年以來，學者們曾針對台灣金線連全草萃取物質進行有系統的藥效分析與急毒性研究，所獲得的試驗結果大多證明可將之歸類爲無毒或少毒性的藥草。例如，測試台灣金線連水煎液對白鼠急毒性反應的研究顯示，若以相當於最高劑量之 5 g/kg 強迫餵食白鼠 7 天及 14 天後，調查雌、雄鼠之平均體重雖較對照組稍低，但試驗結束後，處理組之白鼠均未產生臨床症狀或

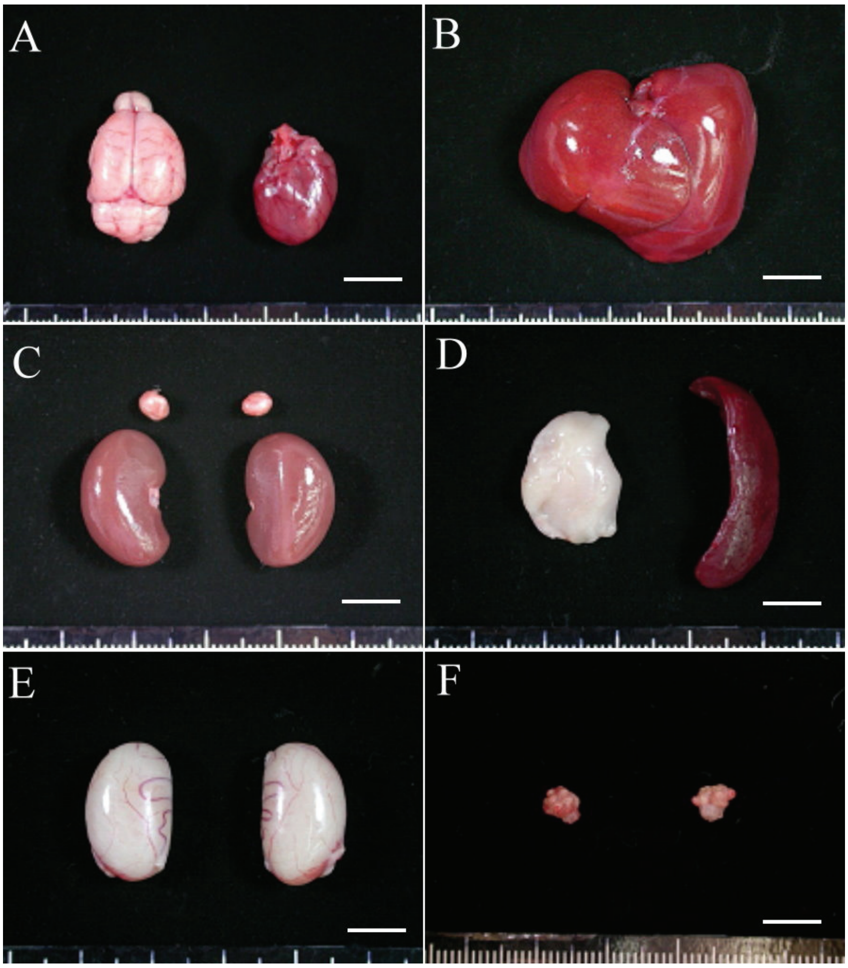


圖 1. 台灣金圓酒口服急毒性試驗處理組大鼠體內臟器之肉眼病理觀察圖片。
(A) 腦 (左) 及心臟 (右)，比例尺＝1 cm；(B) 肝臟，比例尺＝1.1 cm；(C) 腎上腺 (上) 及腎臟 (下)，比例尺＝0.9 cm；(D) 胸腺 (左) 及脾臟 (右)，比例尺＝0.9 cm；(E) 睪丸，比例尺＝0.9 cm；(F) 卵巢，比例尺＝0.9 cm。

Fig. 1. Gross findings of rats in the Taiwan Jin-Yuan wine acute oral toxicity test.
(A) brain (left) and heart (right), scale bar = 1 cm; (B) liver, scale bar = 1.1 cm; (C) adrenal gland (above) and kidney (below), scale bar = 0.9 cm; (D) thymus (left) and spleen (right), scale bar = 0.9 cm; (E) testis, scale bar = 0.9 cm; (F) ovary, scale bar = 0.9 cm.

死亡情形 (Liu *et al.* 1998)；另以台灣金線連水粗抽液連續 90 天經口投予大鼠飲用，試驗顯示長期食用之安全劑量爲 0.5 g/kg (約爲鮮品 16.7 g/kg) (Lin *et al.* 2000a)；若由母鼠妊娠第 7 天起至產後第 28 天止，每日投予台灣金線連水粗抽物劑量達 2.0 g/kg，對其體重、攝食量及新生兒出生指數等無顯著影響，也對於產後 4 天之新生兒生存指數、離乳指數、運動量和學習能力等無不良影響 (Lin *et al.* 2000b)。上述各項研究多是針對台灣金線連原料進行安全性評估，本試驗則是以台灣金線連擬商品化之酒製品 (台灣金圓酒) 爲材料，進行對大鼠 (SD 品系) 之口服急毒性測試。供試樣品經口服投予大鼠並完成階段實驗後，全部鼠隻也無中毒症狀或死亡的情形發生；另外，不論對照組與處理組之雄鼠或雌鼠，在供試第 14 天時之平均體重和增重百分比相較並未發現明顯差異 (表 1)；在試驗結束後，依序檢查雄鼠和雌鼠之血液值變化，不論是白血球總數、紅血球總數、血紅素、血球容積比、平均紅血球體積、平均血紅素濃度以及白血球分類等也無明顯差異 (表 2)；若在白血球分類方面，處理組雄鼠之單核球比例與對照組比較稍低 (表 3)，但淋巴球與單核球在正常大鼠比例分別爲 70–90%以及 0–10%，因此，在臨床上應無明顯病理意義。

在一項探討台灣金線連對於保護大白鼠活體肝臟的研究顯示，台灣金線連之乙酸乙酯層能有效減輕對位乙烯胺基酚和 D-半乳糖氨誘發之大白鼠急性肝損傷，除了可以降低血清中轉胺酵素濃度外，並能降低肝細胞脂質過氧化產物數量，換言之，台灣金線連之乙酸乙酯層應具有最強之抗脂質過氧化、清除超氧自由基和保護肝臟細胞的效果 (Hung 2000)。研究口服台灣金圓酒之處理組雌鼠在血清肝腎酵素值方面變化之結果顯示，天門冬酸轉氨酶含量較對照組雌鼠稍低，但仍位於正常值 80.86–194.14 mg/dL 範圍內，在臨床上應無明顯病理意義；另氨基丙酸轉氨酶、肌氨酸及尿素氮值等項目均無與試驗物質有關之影響 (表 4)。比較體內臟器重量包括腦、心、肝、腎臟、脾臟、胸腺、腎上腺、睪丸及卵巢重量及百分比與對照組比較也無明顯差異 (表 5)；對照組與處理組之重要臟器也無因試驗物質引起之肉眼及組織病理變化 (圖 1)。

綜合上述各項試驗結果得知，台灣金圓酒對於大鼠口服急毒性 LD_{50} 值應大於 5 g/kg，若以成人每人平均體重 70 kg 及每隻大鼠平均體重 200 g 爲計算基礎，再以動物體表面積比率換算成人之體表面積約爲大鼠之 56 倍，可換算出成人安全飲用量應設定於 56 g 爲宜，此項結果已初步完成食品安全性評估中之一項重要試驗，未來將再進行另一項沙門菌回復突變之 Ames 試驗，以使台灣金圓酒之食品安全性評估更爲周全，期望此一酒品未來在技術移轉合法酒莊商業量產之後，可以提供國人另一種養生飲品並能增加國內稻農和果農們實質收益，促進相關產業與農村經濟的發展。

引用文獻 (Literature cited)

Du, X. M., N. Y. Sun, T. Tamura, A. Mohri, M. Sugiura, T. Yoshizawa, N. Irino, J. Hayashi, and Y. Shoyama. 2001. Higher yielding isolation of kinsenoside in *Anoectochilus* and its anti-hyerliposis effect. Biol. Pharm. Bull. 24:65–69.

Du, X. M., T. Yoshizawa, and Y. Shoyama. 1998. Butanoic acid glucoside composition of whole body and *in vitro* plantlets of *Anoectochilus formosanus*. Phytochemistry 49:1925–1928.

Huang, D. D., R. C. S. Law, and O. T. Mak. 1991. Effects of tissue-cultured *Anoectochilus formosanus* Hay. extracts on the arachidonate metabolism. Bot. Bull. Aca. Sin. 32:113–119.

Hung, D. F. 2000. The mechanism study of hepatoprotective activity of *Boehmeria* species and *Anoectochilus* species. Master thesis, Kaohsiung Medical Univ., Kaohsiung. 95 pp. (in Chinese)

Liang, W. L., R. C. Chen, Y. J. Chiang, C. H. Su, L. L. Yang, and K. Y. Yen. 1990. Study on *Anoectochilus* species I. Study on the physiological activities of Jin-Xian-Lian. Formosan Sci. 43:47–58.

Lin, J. M., C. C. Lin, H. F. Chiu, and S. G. Lee. 1993. Evaluation of the anti-inflammatory and liver-protective effects of *Anoectochilus formosanus*, *Ganoderma lucidum* and *Gynostemma pentaphyllum* in rats. Am. J. Chin. Med. 21:59–69.

Lin, W. C., C. C. Shih, and Y. W. Wu. 2000a. Effects of crude aqueous extracts of *Anoectochilus formosanus* Hayata administered to pregenant and lacting rats on their offspring. J. Chin. Med. 11:79–86. (in Chinese with English abstract)

Lin, W. C., C. C. Shih, Y. W. Wu, I. J. Chen, H. L. Chang, and C. T. Hsu. 2000b. Ninety-day oral toxicity study of crude aqueous extracts of *Anoectochilus formosanus* Hayata in rats. J. Chin. Med. 11:19–29. (in Chinese with English abstract)

Liu, S. Y., T. W. Chang, J. Y. Wang, A. H. Chang, and S. C. Wang. 1998. Studies on the varietal characters and acute toxicity of *Anoectochilus* spp. J. Agric. Res. China 47:242–258. (in Chinese with English abstract)

Liu, C. Z., Y. C. Wang, X. Z. Kang, Y. F. Ou, H. C. Ye, and G. F. Li. 1999. Artemisinin production by adventitious shoots of *Artemisia annua* in a novel mist bioreactor. Acta Bot. Sin. 41:524–527. (in Chinese)

Mak, O. T., D. D. Huang, and R. C. S. Law. 1990. *Anoectochilus formosanus* Hay. contains substances that affect arachidonic acid metabolism. Phytother. Res. 4:45–48.

Shackelford, C., G. Long, J. Wolf, C. Okerberg, and R. Herbert. 2002. Qualitative and quantitative analysis of nonneoplastic lesions in toxicology studies. Toxicol. Pathol. 30:93–96.

Tzeng, S. H. 2005. Tissue culture of *Anoectochilus formosanus* Hayata and quantitative analysis of gastrodin. Master Thesis of National Chung-Hsing Univ., Taichung. 93 pp. (in Chinese with English abstract)

Wang, S. Y., Y. H. Kuo, H. N. Chang, H. S. Tsay, K. F. Lin, N. S. Yang, and L. F. Shyur. 2002. Profiling and characterization of antioxidant activities in *Anoectochilus formosanus* Hayata. J. Agric. Food Chem. 50:1859–1865.

Yu, Y. L., C. K. Cheng, B. J. Chen, M. J. Cheng, H. H. Cheng, W. J. Chang, H. H. C. Chen, C. C. Hong, P. J. Lee, S. C. Liang, K. S. Sheu, Y. Y. Sung, C. N. Weng, C. W. Tsai, C. S. Wang, M. H. Wang, L. S. Yen, C. K. Yu, and J. Y. L. Yu. 2005. A guidebook for the care and use of laboratory animals. The Chinese Society for the Laboratory Animal Science. 3rd Edition, Taiwan. 209 pp. (in Chinese)

Risk Assessment of the Bioproduct of *Anoectochilus formosanus* Hayata
I. Acute Toxicity of the Taiwan Jin-Yuan Wine in Rats[1]

Yih-Juh Shiau[2], Jiunn-Wang Liao[3], and Min-Tze Wu[2,4]

Abstract

Shiau, Y. J., J. W. Liao, and M. Z. Wu. 2008. Risk assessment of the bioproduct of *Anoectochilus formosanus* Hayata I. Acute toxicity of the Taiwan Jin-Yuan wine in rats. J. Taiwan Agric. Res. 57:183–192.

Ethanol extracts of *Anoectochilus formosanus* Hayata (AF) have been known to protect liver injury, ease pain, diuretic, decrease hyperglycemia and hypertension. However, the safety of AF extracts along or in combination with other materials, such as Taiwan Jin-Yuan wine, is still needed to elucidate before marketing. The objective of this study was conducted to evaluate the acute oral toxicity of Taiwan Jin-Yuan wine in Sprague Dawely (SD) rats. Rats were single given with Taiwan Jin-Yuan wine at a limited dose of 5 g/kg body weight and consecutively observed for 14 days. Results revealed no poison symptom or death in the control and treated rats. The acute oral LD_{50} of Taiwan Jin-Yuan wine inferred greater than 5 g/kg body weight in rats. No significant changes of body weight at intervals on day 0, 7 and 14 post-treatment. The hematological parameters of white and red blood cell counts, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration, platelets and white blood differentiation were normal. Furthermore, serum biochemistry showed no alteration in liver and renal function of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, blood urea nitrogen and creatinine. The organ weights of brain, heart, liver, kidney, spleen, adrenal, testis and ovary had no significant changes between control and treatment groups. No gross and histopathological changes of rats after treated with Jin-Yuan wine was found in the acute oral toxicity test. This study concludes that there are no harmful effects on rats fed orally with AF-containing Taiwan Jin-Yuan wine at a daily dose of 5 g/kg body weight for 14 days.

Key words: Acute oral toxicity test, *Anoectochilus formosanus* Hayata, Medicinal herb, Rat, Risk assessment.

---

1. Contribution No.2326 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: August 8, 2008.
2. Respectively, Assistant Researcher, Researcher and Director, Biotechnology Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Associate professor, Graduate Institute of Veterinary Pathobiology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
4. Corresponding author, e-mail: wu@wufeng.tari.gov.tw; Fax: (04)23302806.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 57(3):193–204 (2008)

水稻秧苗期耐鹽性之篩選技術[1]

卓緯玄[2] 陳治官[2,5] 賴明信[2] 顏信沐[2] 曾東海[3] 顏宏真[4]

摘　要

卓緯玄、陳治官、賴明信、顏信沐、曾東海、顏宏真。2008。水稻秧苗期耐鹽性之篩選技術。台灣農業研究 57:193–204。

本試驗以水稻台農 67 號經疊氮化鈉化學誘變純化之突變庫中之品系為材料，以 1/2 改良式木村氏水耕液外加 150 mM NaCl 進行秧苗期耐鹽性篩選；試驗結果顯示，大部份品系在鹽分逆境處理後 5–7 天與第 11–14 天間產生兩個劇烈轉折變化，鹽害指數由原先較低的情形快速昇高，顯示此兩個時間點對於大部份參試品系耐鹽性具有重要影響。本試驗除成功建立水稻秧苗期對於鹽分逆境傷害反應基礎資料及篩選程序外，並發現台農 67 號突變庫不同品系之秧苗期耐鹽性表現變異度很大，選取秧苗期對於鹽分逆境具耐、感性的水稻突變品系各 8 個進行農藝性狀調查結果顯示，所篩選耐鹽性突變品系之農藝性狀均有較佳表現，顯示此種篩選技術可適用於育種程序中後代品系選拔，成功建立後代快速篩選技術，將可應用於耐鹽性水稻品種改良。

關鍵詞：水稻、秧苗期、耐鹽性、台農 67 號突變品系。

前　言

作物在生產過程中，一些生物性逆境或非生物性逆境等外在環境因子常影響其正常的生長與發育而降低產量或品質，其中鹽害與乾旱的影響是最主要的非生物性逆境因素。土壤鹽害通常是由於自然或人為的影響，使得累積在土壤中的鹽分溶解至土壤水分中進而影響作物生長發育；現有耕地中由於環境變化及人為因素，導致鹽害的影響日益增加 (Oldeman *et al.* 1991; Flowers & Flowers 2005)。

作物耐鹽性是一種複雜的特性，牽涉多種生理和代謝途徑 (Ashraf & Harris 2004; Menezes-Benavente *et al.* 2004)，鹽害一般認為是由於離子、滲透潛勢和細胞體內水分平衡的破壞，作物生長在鹽化土壤環境中通常會受到高鹽分含量及水分缺乏的限制；然而不同作物品種 (系)

---

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2327 號。接受日期：97 年 8 月 19 日。
2. 本所作物組助理研究員、副研究員、副研究員、助理研究員。台灣 台中縣 霧峰鄉。
3. 本所生物技術組副研究員。台灣 台中縣 霧峰鄉。
4. 國立中興大學生命科學院生命科學系教授。台灣 台中市。
5. 通訊作者，電子郵件：cgchern@wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04)23399544。

對於鹽分逆境的反應不一，在鹽害土地生長的作物品種大多同時具有適應乾旱和鹽分逆境的特性，以達成充分利用土壤中有限水分的目的。近來有許多學者利用各種方法選育出耐鹽作物品種 (Al-Khatib *et al.* 1993; Ashraf 2002; Chinnusamy *et al.* 2005)，作物的耐鹽性在農藝上的特徵表現包含了作物本身耐鹽生理機制和環境的交感效應，因而典型的耐鹽性農藝篩選指標如產量 (Zeng & Shannon 2000)、存活率、株高 (Noble & Rogers 1992)、葉面積 (Franco *et al.* 1993)、葉片傷害指數 (leaf injury, Munns 1993)、相對生長速率 (relative growth rate, Munns & Termaat 1986) 及相對生長減少量 (relative growth reduction, He & Cramer 1992) 等，均各有其重要性，且對應不同生長階段的耐鹽性。產量作爲耐鹽性篩選指標雖有助於品種 (系) 的直接利用，但往往需耗費時間和大量人力，且僅應對於生殖生長階段的耐鹽性；株高、葉面積、相對生長速率及相對生長減少量等指標也需繁雜的調查程序及耗費更多的人力；若欲增進育種效率，亟需一套簡便且易行的篩選方式；由於作物在逆境下會產生傷害，因此目測判別植株傷害性指數在多種逆境反應中曾被廣泛應用，若再配合標準化指數定義可有效區分出不同的傷害等級 (Munns 1993; IRRI 2002)。

水稻 (*Oryza sativa* L.) 爲世界上主要的糧食作物之一，隨著人類不斷的開發和利用土地的同時，土壤次生鹽漬化也在不斷發展 (Oldeman *et al.* 1991)，導致鹽化地面積逐漸擴大，對糧食生產帶來嚴重威脅。而靠土壤改良、種子處理等措施已不能滿足其生產要求，因此，提高水稻品種的耐鹽性是推動鹽化土壤地區水稻生產穩定發展最有效的措施之一。台灣地區水稻育種技術發達，長久以來已育成許多優良抗病、抗蟲、高產且品質優良之水稻品種，然而目前所育成的水稻推廣品種，對於鹽分逆境均非常敏感；復因以往的育種程序均未針對耐鹽特性進行選拔評估，至今尚無適合於鹽分地栽培之品種育成。隨著未來農用水資源分配減少的影響，水田因缺乏大量農業用水的沖洗，土壤次生鹽漬化面積將面臨增加之趨勢，因此建立台灣地區水稻耐鹽性之基礎資料與選拔技術爲值得重視之工作。本研究以水稻台農 67 號 (Tainung 67, TNG 67) 經疊氮化鈉 (Sodium azide, NaN_3) 誘變，並以譜系法選拔純化 10 代 (M 10) 以上之突變品系及若干栽培品種爲材料進行試驗，建立水稻耐鹽性快速篩選系統，並進行水稻台農 67 號突變品系耐鹽性之篩選，期能篩選出若干對於鹽分逆境反應具有差異的水稻突變品系。

材料與方法

耐鹽性突變品系之篩選

試驗採用水稻 TNG 67 與其經疊氮化鈉誘變處理並以譜系法選拔純化 10 代上之 465 個突變品系，以及 IR 20、IR 28、IR 30、IR 34、IR 44、IR 52、OS 4、KELE RATA 1-24、Doddabyranellu、Omachi、Nona Bokra、Norin 12、T(N) 1、TC 65 及 TK 8 等 15 個國內外栽培品種，合計 480 品種 (系) 爲材料，其中 Nona Bokra 爲耐鹽性對照品種、IR 28 爲感鹽性對照品種。所有材料栽培於農業試驗所之試驗田，依一般慣行法進行田間管理，並於成熟期收穫完熟水稻種子，置於精密通風式烘箱中以 40℃ 烘乾至穀粒含水量爲 13–14 %，再以重力式風選機風選充實飽滿之種子，儲存於 4℃ 冷藏庫中，做爲試驗使用之材料。

試驗秧苗之培育採水耕方法進行，參試品種 (系) 之種子經浸種、消毒及催芽後，每品種 (系) 選取剛萌芽露白種子 5–10 粒播種於自行設計之水耕栽培盤孔上，置於簡易網室內，以 1/2 改良

式木村氏 B 培養液 (Kimura B solution) (Yoshida *et al.* 1976) 培育秧苗，其組成分爲 $(NH_4)_2SO_4$ 172 μM、KNO_3 92 μM、$MgSO_4$ 134 μM、KH_2PO_4 91 μM、Fe-citrate 31 μM、$Ca(NO_3)_2$ 127 μM、H_3BO_3 2.5 μM、$MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.201 μM、$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.201 μM、$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.052 μM、H_2MoO_4 0.044 μM。種子播種、水耕培育 14 天後 (秧苗約達 3–4 葉齡時)，添加 150 mM NaCl 於培養液中進行鹽分逆境處理，於鹽處理後第 1、3、5、7、9、11、14 及 21 天，參考修改國際水稻研究所 (International Rice Research Institute, IRRI) 之水稻標準評估系統手冊 (Standard Evaluation System for rice, SES) (IRRI, 2002) 所定鹽害分級標準，依植株葉片捲曲及乾枯白化程度區分爲 0、1、3、5、7 及 9 等 6 個等級 (圖 1) 進行目視調查並紀錄其鹽害指數。試驗期間依照水耕液電導度添加逆滲透水調整培養液濃度，篩選試驗之水稻參試品種 (系) 採順序排列，重複三次，調查所得資料計算其平均值。

分析篩選所獲得之資料，選取敏感性品系及耐受性品系，分別添加 125 mM NaCl 處理進行感鹽性突變品系之重複篩選，另以 150 mM NaCl 處理進行耐鹽性突變品系之重複篩選。處理期間依照水耕液電導度添加逆滲透水調整培養液濃度，並於處理後調查其鹽害指數，水稻參試品種 (系) 採順序排列，重複三次，調查所得資料計算其平均值。

圖 1. 水稻秧苗耐鹽性調查標準 (鹽害指數)。0：植株生長正常。1：植株葉片捲曲或下位葉黃化。3：植株葉片先端乾枯白化。5：植株葉片約 1/2 乾枯白化。7：植株葉片大部份 (約 2/3) 乾枯白化。9：植株完全白化枯死。

Fig. 1. Standard investigation scales for salt injury (Salt injury score) in rice seedlings. 0: Growth nearly normal. 1: Some leaves rolled or discolored. 3: Some leaves tip drying. 5: Some leaves (about 1/2 of plant) drying. 7: Most leaves (about 2/3 of plant) drying. 9: Almost all plants dead and drying.

耐、感鹽性突變品系基本農藝性狀調查

根據前述耐、感鹽性重複篩選結果，分別選取 8 個感鹽性突變品系、8 個耐鹽性突變品系，以及誘變親本 TNG 67 (感鹽性)、耐鹽性品種 Nona Bokra 及感鹽性品種 IR 28 等三個對照品種，共 19 個品種 (系) 爲材料，進行基本農藝性狀調查。供試品種 (系) 經育苗後，採單本植，栽培於農業試驗所之試驗田中，每品種 (系) 種植 6 行 ，每行 40 株，行株距 30 × 15 cm，依一般慣行法管理。生育期間調查抽穗期，成熟期調查株高後每品種 (系) 逢機取樣 20 個單株進行考種，調查穗長、穗數、穗重、實粒數、虛粒數、實粒重及虛粒重，再計算一穗穎花數、稔實率、千粒重等產量構成要素及單株產量。

結　　果

耐鹽性突變品系之大量篩選

本試驗所採用之主要材料爲 TNG 67 經疊氮化鈉誘變所建立之突變品系，採用 150 mM NaCl 做爲試驗篩選濃度，在簡易網室中進行連續三星期的鹽害指數調查。結果顯示隨著鹽分處理時間的增加，秧苗受到鹽分逆境之傷害愈趨嚴重；以傷害性指數爲基礎進行目測判別參試品種 (系) 的鹽害指數，統計結果列於圖 2。由傷害性指數變化發現，部份品系在鹽分處理早期即有較高的鹽害指數表現，顯示其受鹽分逆境之傷害反應較爲迅速，但隨後則產生適應的情形，以致於後期調查之傷害程度並非參試品系最高者；而部份品系則表現出相反的情形，早期表現出較低之鹽害指數，一段

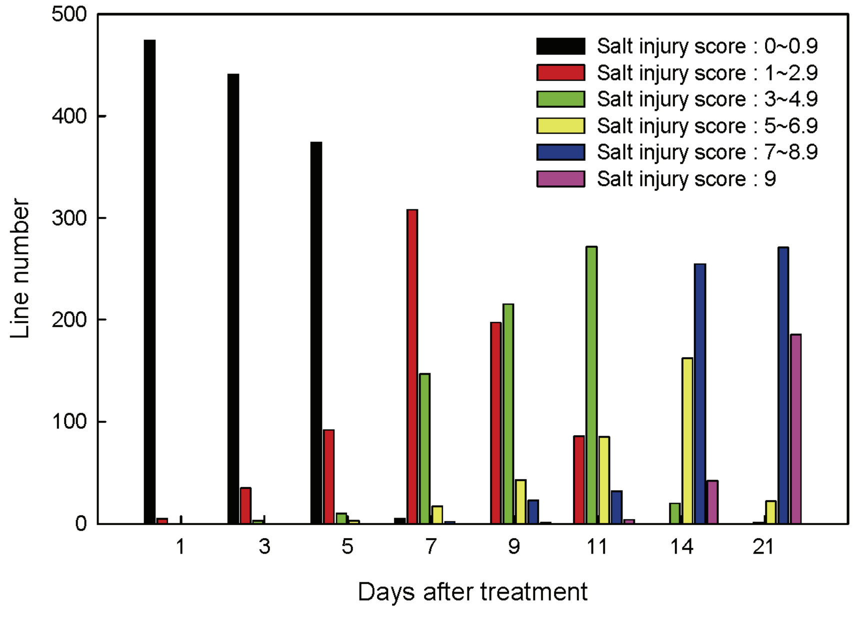


圖 2. 水稻供試品種 (系) 以 150 mM NaCl 進行秧苗期耐鹽性篩選，在不同調查時間之平均鹽害指數頻度分布變化。

Fig. 2. Changes in the average salt injury score on rice seedlings under 150 mM NaCl treatment.

時間後即迅速死亡，顯示水稻不同品種 (系) 對於鹽分逆境之反應不甚一致。試驗中大部份品系在鹽分逆境處理第 5–7 天與第 11–14 天間產生兩個劇烈轉折變化，鹽害指數由原先較低的情形快速昇高，顯示此兩個時間點對於參試之大部份品系具有重要之影響。統計參試品種 (系) 在不同調查時期依鹽害指數分級之頻度分布，結果顯示在 150 mM NaCl 篩選濃度下，處理 14 天後仍有 20 個品系表現出較佳耐鹽性，其平均鹽害指數介於 3.0–4.9 間；有 42 個品系表現出較敏感的情形，其平均鹽害指數均已達 9.0，亦即已完全死亡。分析資料頻度分布型態，發現在處理後第 11 或 14 天之資料較接近常態分布，因此，下一階段重複篩選係以鹽分逆境處理後 11–14 天調查之鹽害指數資料爲基礎進行分析排序，選取敏感性品系及耐受性品系進行試驗。

耐鹽性突變品系之重複篩選

植物之耐鹽性表現易受環境因素影響，因此，爲降低環境因素的干擾，本試驗利用多次重複性篩選方式，確認已正確篩選出真正的感鹽及耐鹽品系。經由大量篩選所獲得的初步資料中顯示，參試品系對於鹽分逆境在不同調查時間所產生之反應並非爲單一模式，因此，選出第 11 天鹽害指數在 7.0 以上或第 14 天鹽害指數在 9.0 之 30 個品系做爲鹽敏感性重覆篩選之供試品系；另外選出 14 天鹽害指數在 5.0 以下之 30 個品系做爲鹽耐受性重覆篩選之供試品系。重複篩選時，採用較低的鹽分逆境處理濃度 (125 mM NaCl) 進行感鹽性品種 (系) 之篩選，由表 1 結果顯示，處理 5 天後 SA 0413、SA 0593、SA 0611.1 及 SA 0901 等 4 個參試品系之平均鹽害指數達 7.0，顯示這 4 個參試品系對於鹽分逆境非常敏感；處理 7 天後大部份供試品系均呈現高度的傷害，鹽害指數均已達 5.0 以上，其中有 15 個參試品系已接近枯死狀態，鹽害指數高達 7.0 以上，感鹽性對照品種 IR 28 在處理 7 天後鹽害指數亦達 7.0。耐鹽性品種 (系) 之重複篩選採用 150 mM NaCl 處理進行，結果如表 2 所示，在處理後第 14 天 SA 0646.1、SA 0758、SA 1737、SA 1739、SA 1443 及 SA 1445 等 6 個參試品系之平均鹽害指數均在 4.0 以下，耐鹽性對照品種 Nona Bokra 之平均鹽害指數爲 2.3，另一耐鹽性對照品種 KR 1–24 之平均鹽害指數則爲 4.3，均高於 SA 0646.1 等 6 個參試品系；誘變親本 TNG 67 在鹽分處理後第 14 天之平均鹽害指數則爲 7.0，顯示 TNG 67 之秧苗期的耐鹽性不佳。

耐、感鹽性突變品系之農藝性狀

本試驗於秧苗期篩選時發現部份感鹽性品系之秧苗生長勢極差，故在重複篩選中剔除秧苗生長勢差之品系，其餘品系依一般慣行法種植於行政院農業委員會農業試驗所試驗田，觀察其田間生長勢，調查其農藝性狀及產量構成要素。調查結果如表 3、表 4 所示，8 個耐鹽性突變品系及 2 個感鹽性品系 SA 0497 和 SA 0604 之株高均高於誘變親本 TNG 67，而 SA 0414、SA 0593 和 SA 0717 則略矮於 TNG 67。單株產量以耐鹽品系 SA 1737、SA 1443 及 SA 1445 明顯高於 TNG 67，其他參試品系均低於 TNG 67，其中又以 SA 1739、SA 0414、SA 0593 及 SA 0717 之單株產量均低於 10 g。插秧至抽穗之生育期 SA 0414 和 SA 0497 明顯較 TNG 67 晚熟，SA 0604 則屬早熟性品種，插秧至抽穗僅 54 天，與感鹽性對照品種 IR 28 之 58 天較爲相近。穗重則以 SA 1443 最重，SA 0717 最輕。穎花數 SA 1739 最多，SA 0717 最少； SA 1739 和 SA 0717 之稔實率均低於 35%。千粒重以 SA 0435 最低，僅約 17 g。綜合上述可知，耐鹽性突變品系以 SA 1733、SA 1737、SA 1443 及 SA 1445 之一般農藝性狀較佳，具有大粒、高產、穗穀粒著粒較疏、分蘖數適中及稔實率高等優良特性；感鹽性突變品系則僅有 SA 0604 和 SA 0497 之表現稍佳。

表 1. 水稻台農 67 號感鹽性突變品系經 125 mM NaCl 處理後不同時間之平均鹽害指數變化

Table 1. Changes in the average salt injury score at different time after 125 mM NaCl treatment for the salt-sensitive mutant lines of Tainung 67 rice

	Salt injury score							
Line or variety	1 day [z]	3 day	5 day	7 day	9 day	11 day	14 day	21 day
IR 28	0.0 [y]	3.7	6.3	7.0	8.3	8.3	9.0	9.0
SA 0412	0.0	1.0	3.7	6.3	7.7	7.7	9.0	9.0
SA 0413	0.0	4.3	7.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
SA 0414	0.0	1.0	3.7	7.0	9.0	9.0	9.0	9.0
SA 0420	0.0	1.0	3.0	6.3	7.0	7.7	8.3	9.0
SA 0421	0.0	1.0	3.0	5.0	7.0	7.7	8.3	9.0
SA 0429	0.0	1.0	6.3	7.0	8.3	9.0	9.0	9.0
SA 0429.1	0.0	1.0	4.3	7.0	7.0	7.0	9.0	9.0
SA 0435	0.0	1.0	4.3	6.3	7.7	8.3	9.0	9.0
SA 0496	0.0	0.7	3.0	6.3	8.3	8.3	9.0	9.0
SA 0497	0.0	0.7	3.0	6.3	7.7	7.7	9.0	9.0
SA 0497(2)	0.0	1.0	3.0	6.3	7.0	7.0	9.0	9.0
SA 0593	0.0	3.0	7.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
SA 0604	0.0	3.0	5.7	7.0	8.3	8.3	9.0	9.0
SA 0604.1	0.0	3.0	5.7	7.0	8.3	9.0	9.0	9.0
SA 0611.1	0.0	1.7	7.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
SA 0612.1	0.0	1.7	6.3	8.3	9.0	9.0	9.0	9.0
SA 0679.1	0.0	1.0	3.0	6.3	8.3	8.3	9.0	9.0
SA 0686.1	0.0	1.0	3.0	5.0	7.0	7.0	9.0	9.0
SA 0716	0.0	1.0	5.0	7.7	9.0	9.0	9.0	9.0
SA 0717	0.0	1.0	4.3	7.0	8.3	9.0	9.0	9.0
SA 0804.1	0.0	1.0	5.0	7.0	7.7	8.3	9.0	9.0
SA 0877	0.0	0.0	3.0	5.0	7.0	7.0	9.0	9.0
SA 0901	0.0	1.0	7.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
SA 0912	0.0	1.7	5.7	8.3	8.3	8.3	8.3	9.0
SA 1039.1	0.0	0.7	3.7	5.0	8.3	8.3	9.0	9.0
SA 1049.1	0.0	0.3	4.3	5.0	7.7	7.7	9.0	9.0
SA 1050	0.0	1.0	3.0	5.0	7.0	7.0	9.0	9.0
SA 1082	0.0	1.7	5.7	7.7	9.0	9.0	9.0	9.0
SA 1363	0.0	1.0	3.0	6.3	7.0	7.7	9.0	9.0

[z] Days after treatment in 125 mM NaCl solution .

[y] Average of three independent experiments.

表 2. 水稻台農 67 號耐鹽性突變品系經 150 mM NaCl 處理後不同時間之平均鹽害指數變化

Table 2. Changes in the average salt injury score at different time after 150 mM NaCl treatment for the salt-tolerant mutant lines of Tainung 67 rice

	Salt injury score							
Line or variety	1 day [z]	3 day	5 day	7 day	9 day	11 day	14 day	21 day
TNG 67	0.0 [y]	0.0	1.0	3.0	5.0	5.7	7.0	9.0
Nona Bokra	0.0	0.0	1.0	1.0	1.0	1.7	2.3	5.0
KR 1-24	0.0	0.0	1.0	2.3	3.0	4.3	4.3	8.3
SA 0418	0.0	0.0	1.0	3.0	5.0	6.3	7.0	9.0
SA 0503.13	0.0	0.0	1.0	3.0	4.3	5.0	5.7	8.3
SA 0503.14	0.0	0.3	1.0	3.0	4.3	5.0	6.3	8.3
SA 0571	0.0	0.0	1.0	1.7	3.7	4.3	5.0	9.0
SA 0572	0.0	0.0	1.0	1.7	3.7	3.7	5.0	7.7
SA 0573.11	0.0	0.0	1.0	2.3	4.3	4.3	5.0	9.0
SA 0587.21	0.0	0.0	1.0	1.7	4.3	4.3	6.3	8.3
SA 0587.22	0.0	0.0	1.0	1.7	3.0	4.3	5.0	7.7
SA 0642	0.0	0.0	1.0	1.0	3.0	3.7	5.0	7.7
SA 0646	0.0	0.0	1.0	1.0	3.7	4.3	5.0	7.7
SA 0646.1	0.0	0.0	1.0	1.0	3.0	3.0	3.0	7.0
SA 0672.02	0.0	0.7	1.0	2.3	4.3	4.3	6.3	9.0
SA 0677	0.0	1.0	1.0	3.0	5.7	5.7	7.7	9.0
SA 0756.11	0.0	0.0	1.0	2.3	5.0	5.7	7.7	9.0
SA 0758	0.0	0.0	1.0	1.0	1.7	1.7	3.0	7.0
SA 0791	0.0	0.0	1.0	5.0	7.0	7.0	8.3	9.0
SA 0801.1	0.0	0.0	1.0	1.0	3.7	3.0	4.3	8.3
SA 0802	0.0	0.0	1.0	1.7	3.7	3.7	5.0	9.0
SA 0881	0.0	0.0	1.0	1.0	3.0	3.0	5.0	7.0
SA 0925.1	0.0	0.0	1.0	3.0	5.7	5.7	6.3	9.0
SA 1036	0.0	0.0	1.0	3.0	5.0	5.0	6.3	9.0
SA 1678	0.0	0.0	1.0	3.0	6.3	7.0	7.7	9.0
SA 1733	0.0	0.0	1.0	1.7	3.0	3.0	4.3	7.7
SA 1737	0.0	0.0	1.0	1.7	3.0	3.0	3.0	7.0
SA 1739	0.0	0.0	1.0	2.3	3.0	3.0	3.0	6.3
SA 1443	0.0	0.0	1.0	2.3	2.3	3.0	3.7	7.7
SA 1445	0.0	0.0	1.0	1.0	2.3	2.3	3.0	7.0

[z] Days after treatment in 150 mM NaCl solution .

[y] Average of three independent experiments.

表 3. 水稻台農 67 號及其耐、感鹽突變品系之農藝性狀

Table 3. Agronomic characteristics of salt-tolerant and salt-sensitive lines in the mutants of Tainung 67 rice

Line or variety	Salt response [z]	Growth duration (day) [y]	Plant height (cm)	Panicle length (cm)	Panicle weight (g)	Grain yield (g / plant)
Nona Bokra	R	88	158.4	21.4±0.2 [x]	2.3±0.10	16.4±1.8
SA 0646.1	R	61	106.4	19.2±0.3	1.3±0.05	11.2±1.0
SA 0758	R	65	122.6	22.8±0.2	1.7±0.03	13.4±0.4
SA 801.1	R	63	111.9	18.9±0.2	1.3±0.05	14.1±1.4
SA 1733	R	75	100.8	23.7±0.2	2.7±0.06	22.3±1.4
SA 1737	R	75	100.5	23.6±0.1	2.8±0.07	27.3±1.8
SA 1739	R	69	95.1	26.1±0.2	1.6±0.06	9.4±0.5
SA 1443	R	75	102.3	23.3±0.2	2.8±0.08	33.0±1.4
SA 1445	R	75	105.2	22.9±0.1	2.7±0.06	26.5±1.3
TNG 67	S	72	92.9	18.9±0.2	2.3±0.05	24.3±1.1
IR 28	S	58	89.2	21.5±0.2	1.8±0.05	23.5±1.2
SA 0414	S	91	80.2	16.4±0.2	1.1±0.05	5.3±0.2
SA 0435	S	79	91.7	18.1±0.2	1.6±0.06	14.0±0.8
SA 0496	S	79	107.6	23.1±0.3	2.1±0.09	12.6±1.3
SA 0497	S	91	108.1	27.2±0.4	2.3±0.15	17.8±1.5
SA 0593	S	79	80.1	17.3±0.2	1.3±0.05	8.7±0.6
SA 0604	S	54	110.2	20.2±0.1	1.6±0.04	20.4±1.0
SA 0717	S	79	78.9	17.5±0.3	0.7±0.04	4.8±0.5
SA 1082	S	79	90.8	17.9±0.2	1.4±0.04	14.5±0.9

[z] R: salt-tolerant; S: salt-sensitive.
[y] Growth duration: The days from transplant to heading.
[x] Each value represents the mean±S. E.

討　論

鹽分逆境初期水稻之生長會受到抑制，缺水造成葉片捲曲，接下來由於鹽類離子的累積而產生離子毒害現象，最終導致水稻植體組織受到傷害而壞死，針對這樣的傷害程序發展，可以發展出一套以傷害性指標爲基礎的目測判別方式，用於篩選不同耐鹽性品種之反應；國際水稻研究所 (IRRI) 即據此發展出評估水稻耐鹽性之目測標準，在 IRRI 水稻標準評估系統手冊中將水稻遭遇到鹽分逆境所表現之反應，依葉片乾枯白化程度區分爲 1、3、5、7 及 9 等 5 個等級，應用於分蘗盛期田間之耐鹽性品系篩選。本試驗爲建立一個早期的秧苗期耐鹽性篩選系統，以及瞭解鹽分逆境下水稻不同品種 (系) 秧苗所產生傷害性之時間序列是否具有相似之曲線關係，經由多次預備試驗觀察，結果發現水稻秧苗植株對於鹽分逆境的反應首先是葉片的捲曲，隨後下位葉產生黃化，接下來是葉尖開始乾枯白化，然後擴展至葉片全部，最終導致植株死亡；據此將判別標準略加修改，將傷害等級區分爲 0、1、3、5、7 及 9 六個等級 (圖 1)，由表 1 及表 2 的結果顯示此種分級方式的確可以有效區分秧苗耐鹽程度。

表 4. 水稻台農 67 號及其耐、感鹽突變品系之產量構成要素表現

Table 4. Performance of yield components of salt-tolerant and salt-sensitive lines in the mutants of Tainung 67 rice

Line or variety	Salt response[z]	Panicle number (number/plant)	Spikelet number (number/panicle)	Fertility (%)	1000-grain weight (g)
Nona Bokra	R	8.1±0.4[y]	111.4±2.6	71.2±2.5	24.8±0.6
SA 0646.1	R	11.5±1.0	73.2±3.3	48.4±2.2	27.7±0.8
SA 0758	R	10.8±0.4	135.0±3.3	40.8±1.4	22.9±0.1
SA 801.1	R	13.3±1.2	92.5±3.2	52.3±2.0	21.9±0.2
SA 1733	R	9.3±0.5	108.6±2.4	84.5±1.3	26.0±0.2
SA 1737	R	10.9±0.6	118.1±2.1	82.7±1.5	25.4±0.1
SA 1739	R	9.4±0.6	162.4±4.2	30.8±1.8	21.0±0.2
SA 1443	R	13.2±0.5	117.1±2.6	85.1±1.3	25.1±0.1
SA 1445	R	10.7±0.5	113.1±2.1	86.2±1.4	25.5±0.1
TNG 67	S	12.2±0.6	119.9±3.7	79.9±2.2	21.2±0.2
IR 28	S	15.5±0.7	86.8±2.0	76.0±1.3	23.2±0.1
SA 0414	S	6.4±0.3	86.5±4.3	52.3±1.4	18.8±0.2
SA 0435	S	10.2±0.5	115.2±3.2	71.6±1.5	16.8±0.3
SA 0496	S	7.6±0.7	91.9±3.0	65.9±1.6	27.0±0.2
SA 0497	S	10.1±0.8	97.9±9.8	66.6±2.8	29.3±0.4
SA 0593	S	8.0±0.5	78.5±2.7	69.8±1.5	20.1±0.1
SA 0604	S	14.8±0.6	100.3±2.0	66.6±1.0	20.6±0.1
SA 0717	S	10.7±0.7	62.7±2.5	34.7±2.1	19.9±0.3
SA 1082	S	12.8±0.7	86.1±2.5	70.1±1.4	19.0±0.2

[z] R: salt-tolerant; S: salt-sensitive.
[y] Each value represents the mean±S. E.

本試驗使用 150 mM NaCl 針對水稻台農 67 號突變品系等共計 480 個品種 (系) 進行耐鹽性篩選，結果發現 (資料未列) 在時間變動的鹽害指數調查中，並非所有的品種均有相同的鹽分傷害發展曲線，經初步歸類參試品系大致可區分爲耐受型品系、早期耐受型之感鹽性品系、早期敏感型之耐鹽性品系及敏感型品系四大類群。因此，若僅採用單一調查時間點做爲品種 (系) 間之耐鹽能力依據時，將影響調查資料之代表性；大部份品系在鹽分逆境處理第 5–7 天與第 11–14 天間產生兩個劇烈轉折變化，鹽害指數由原先較低的情形快速昇高，顯示此兩個時間點對於參試之大部份品系具有重要之影響。經由調查數百品種 (系) 對高鹽的反應，得知水稻對高鹽的反應是非常複雜，不同品種 (系) 間之耐鹽性均須個別分析，不可概括而論。

在試驗過程亦發現部份所篩選的感鹽性品系之秧苗生長勢較差，雖試驗中無法針對所有品系所有特性進行調查分析，但這些生理特性最終將反應到該品系之農藝特性上。爲了解在所選獲不同耐

鹽性突變品系農藝特性差異，進一步調查其一般農藝特性，試驗同時挑選多個不同耐感、鹽性突變品系進行農藝特性調查，根據表 3 及表 4 結果顯示，利用此種水耕秧苗耐鹽性篩選方法所選獲耐鹽性突變品系之農藝性狀均有較佳之表現，顯示此種篩選方法可適用於育種程序中後代品系之選拔，成功建立後代快速篩選系統，未來將可應用於耐鹽性水稻品種改良。

水稻耐鹽性篩選與評估方法是選育耐鹽性品種，展開其他相關理論研究的重要基礎。本試驗以傷害性指數爲基礎，建立了秧苗期耐鹽性快速篩選系統，獲得水稻秧苗期對於鹽分逆境之傷害反應基礎資料，並成功篩選出 SA 0646.1、SA 0758、SA 0801.1、SA 1733、SA 1737、SA 1739、SA 1443 及 SA 1445 等 8 個秧苗期對鹽分逆境具耐、感性的水稻突變品系，其中 SA 1733、SA 1737、SA 1443 及 SA 1445 等 4 個品系之農藝性狀優良，未來將進一步探討其生理特性反應及分子機制。

引用文獻 (Literature cited)

Al-Khatib, M., T. McNeilly, and J. C. Collins. 1993. The potential of selection and breeding for improved salt tolerance in lucerne (*Medicago sativa* L.). Euphytica 65:43–51.

Ashraf, M. 2002. Salt tolerance of cotton: Some new advances. Critical Reviews in Plant Sci. 21:1–30.

Ashraf, M. and P. J. C. Harris. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. Plant Sci. 166:3–16.

Chinnusamy, V., A. Jagendorf, and J. K. Zhu. 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. Crop Sci. 45:437–448.

Flowers, T. J. and S. A. Flowers. 2005. Why does salinity pose such a difficult problem for plant breeders? Agric. Water Manage. 78:15–24.

Franco, J. A., C. Esteban, and C. Rodriguez. 1993. Effects of salinity on various growth stages of muskmelon cv. revigal. J. Hortic. Sci. 68:899–904.

He, T. and G. R. Cramer. 1992. Growth and mineral nutrition of six rapid-cycling Brassica species in response to seawater salinity. Plant Soil 139:285–294.

IRRI. 2002. Standard Evaluation System for Rice. International Rice Research Institute, Philippine. 56 pp.

Menezes-Benavente, L., F. K. Teixeira, C. L. A. Kamei, and M. Margis-Pinheiro. 2004. Salt stress induces altered expression of genes encoding antioxidant enzymes in seedlings of a Brazilian indica rice (*Oryza sativa* L.). Plant Sci. 166:323–331.

Munns, R. 1993. Physiological processes limiting plant growth in saline soils: Some dogmas and hypotheses. Plant Cell Environ. 16:15–24.

Munns, R. and A. Termaat. 1986. Whole-plant responses to salinity. Aus. J. Plant Physiol. 13:143–160.

Noble, C. L. and M. E. Rogers. 1992. Arguments for the use of physiological criteria for improving the salt tolerance in crops. Plant Soil 146:99–107.

Oldeman, L. R., R. T. A. Hakkeling, and W. G. Sombroek. 1991. World map of the status of human-induced soil degradation. International Soil Reference and Information Center (ISRIC) (2nd eds), Wageningen. 35 pp.

Yoshida, S. 1976. Routine procedure for growing rice plants in culture solution. p.61–66. *in*: Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice. (Yoshida S., D. A. Forno, J. H. Cook, and K. A. Gomez, eds.) International Rice Research Institute, Manilla, Philippines.

Zeng, L. and M. C. Shannon. 2000. Salinity effects on seedling growth and yield components of rice. Crop Sci. 40:996–1003.

Screening Technique for Salt Tolerance in the Rice Seedling Stage [1]

Woei-Shyuan Jwo[2], Chyr-Guan Chern[2,5], Ming-Hsin Lai[2], Hsin-Mu Yen[2], Tung-Hai Tseng[3], and Hungchen Emilie Yen[4]

Abstract

Jwo, W. S., C. G. Chern, M. H. Lai, H. M. Yen, T. H. Tseng and H. E. Yen. 2008. Screening technique for salt tolerance in the rice seedling stage. J. Taiwan Agric. Res. 57:193–204.

Seedlings obtained from a chemical mutagenized Tainung 67 mutant population were conducted for the salt-tolerance in a hydroponic system containing 150 mM NaCl. The effect of salinity was recorded by salt injury score according to the severity of damage after salt treatment. Most of the mutant lines exhibited two drastic increases in salt injury score at day 5 to 7 days and 11 to 14 days that indicated these two time periods having critical influence on the plant's response to salt. In this study, we developed an effective technique for screening salt-tolerant mutants and obtained manifold fundamental data for salt responses at seedling stage. A high degree of variation in salt response was found among the Tainung 67 mutant lines. Agronomic characteristics of eight salt-tolerant and eight salt-sensitive lines were further investigated. The results showed that salt-tolerant lines had better agronomic performance than those salt-sensitive lines. This revealed that the rapid screening system is valid. This technique will be useful for the application of breeding salt-tolerant rice.

Key words: Rice, Seedling stage, Salt tolerance, Mutant lines.

---

1. Contribution NO. 2327 from Agricultural Research Institute, Council of Agricultural. Accepted: August 19, 2007.
2. Respectively, Assistant Researcher, Associate Researcher, Associate Researcher, Assistant Researcher, Crop Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Associate Researcher, Biotechnology Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
4. Professor, Department of Life Sciences, NCHU, Taichung, Taiwan, ROC.
5. Corresponding author, e-mail: cgchern@wufeng.tari.gov.tw; Fax: (04)23399544.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 57(3):205–212 (2008)

採收方式對鳳梨果實內部褐變之影響[1]

薛百祺[2] 唐佳惠[3] 李堂察[2,4]

摘　　要

薛百祺、唐佳惠、李堂察。2008。採收方式對鳳梨果實內部褐變之影響。台灣農業研究 57:205–212。

台灣鳳梨以徒手摘取及鐮刀割取等方式採收，但以徒手摘取爲主，因果梗部傷口大且不平整，可能影響貯運壽命。徒手摘取之果實經 12.5℃貯藏 2 週再經 25℃櫥架 4 天，所有徒手摘取果實之內部褐化症狀皆已達 5.8 級，故評定爲喪失櫥架壽命；而鐮刀割取之果實冷藏 2 週再經 4 天櫥架後，果實內部褐化程度才達第 2 級。果實採收後苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia lyase; PAL) 活性隨冷藏時間之延長而增加，且徒手摘取之果實 PAL 活性顯著高於鐮刀割取之果實。多酚氧化酶 (polyphenol oxidase; PPO) 及過氧化酶 (peroxidase; POD) 活性隨冷藏時間之延長而降低，但徒手摘取或鐮刀割取間無明顯差異。

關鍵詞：徒手摘取、鐮刀割取、苯丙氨酸解氨酶、多酚氧化酶、過氧化酶。

前　　言

採收作業與流程攸關產品品質、貯運壽命及損耗率等，採收流程中常因機械碰撞 (mechanical impacts) 導致產品表現擦壓傷症狀 (Van Canney *et al*. 2004)，例如機械集貨較徒手操作更容易造成果實損傷 (Lippert *et al*. 2004)，搬運方式 (Berardinelli *et al*. 2004)、堆疊高度及果實排列方式等，也影響果實受傷程度 (Studman 2000)。鳳梨果實是否在採收時受到損傷，通常在集貨當天無法以目視剔除，而在經過裝箱及運輸後，所有已受傷之果實才逐漸顯現達可視程度 (Wang *et al*. 2004)。台灣鳳梨採收方式有以徒手採摘或以鐮刀割取等 2 種，以徒手摘取者採收較爲快速方便，採用之農民不少。然而初步調查結果得知，以鐮刀割取者果實受傷較徒手摘取者少，對貯運後果實褐變程度亦較輕微。因此，鳳梨以徒手摘取或以鐮刀割取，對於鳳梨果實貯運後之貯藏壽命和品質之影響，亟待釐清。

採收器械所攜帶的病原生物，容易由切口感染植株或產品，但因鳳梨植株更新較易，器械採收造成的切口感染問題或可忽略；反觀以徒手摘取之果實，因需握緊果實並折取，使果梗斷面傷口不

---

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2328 號。接受日期：97 年 9 月 3 日。
2. 國立嘉義大學園藝學系前碩士班研究生及教授。台灣 嘉義市。
3. 本所嘉義農業試驗分所園藝系助理研究員。台灣 嘉義市。
4. 通訊作者，電子郵件：tclee@mail.ncyu.edu.tw；傳真：(05)2753295。

平整、受創面積較大，是否造成果實承受之創傷較器械採收嚴重，更非裸目可見。Stewart 等 (2003) 指出，創傷會提高鳳梨果實中多酚氧化酶 (polyphenol oxidase; PPO) 之活性，亦可能導致組織內苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia lyase; PAL) 活性提高 (Dixon & Paiva 1995)。因此，本試驗即針對徒手摘取及鐮刀割取兩種不同採收方式之果實，調查其果心部位 PAL、PPO 及過氧化酶 (peroxidase; POD) 活性在貯運過程中之變化，並觀察三者與果實劣變之關係，期能提出更優良的採收方式，提供果農和業者應用，以增進內外銷鮮食鳳梨之貯運壽命及品質。

試驗材料

本研究供試品種為 ′台農 17 號′ 號鳳梨果實，成熟度為基部 1/3–1/2 轉色，於 95 年 6 月委請屏東縣吳姓專業鳳梨果農在天候晴朗時，分別以徒手摘取及鐮刀割取。徒手摘取採收者未再經過修整果梗立即以直立方式裝箱；鐮刀割取者再修整使果梗長度為 1 cm 後再裝箱。上述 2 種採收方式之果實，均以每箱 12 果裝於瓦楞紙箱中，並限於採摘後 24 hrs 內宅配至實驗室，立即進行試驗。

試驗方法

將二種採收方式所得之果實逐果編號、秤重，再直立置於紙箱中，分別進行 0、1、2 週之冷藏 (12.5 ± 2℃)，與冷藏後加 4 天櫥架 (25 ± 2℃) 之 6 種貯藏試驗後，分別測定果實內部褐化 (internal browning) 程度及酶活性，每樣本為 1 果，計 5 重複。

果實內部褐化程度及貯藏壽命之調查：果實內部褐化程度測定方式按 Paull 和 Rohrbach (1985) 所述，即依症狀分 1 級 (褐化面積佔果心及其附近果肉面積 1–2%)、2 級 (褐化面積佔 3–5%)、3 級 (褐化面積佔 6–10%)、4 級 (褐化面積佔 11–25 %)、5 級 (褐化面積佔 26–50%) 及 6 級 (褐化面積佔 51–100%) 等 6 個等級。當果實內部褐化程度達 4 級時，即視為喪失櫥架壽命。

酶活性分析：取樣時切取果心部位，以液態氮固定後置於-70℃冷凍櫃中備用。酶活性分析時取出，樣品不經回溫直接分析，測定項目包括：

苯丙氨酸解氨酶活性分析：苯丙氨酸解氨酶活性測定方法依 Zhou 等 (2003)，修改為秤取新鮮果心組織 10 g，置於冰浴中，以海砂及含 5 mM β-mercaptoethanol、2 mM EDTA 及 1% PVPP (w/v) 配置成硼酸緩衝液 (borate buffer; 0.1 M, pH 8.8) 15 mL 進行研磨，於4℃靜置 1hr 後濾取 (Adventec 濾紙) 澄清液，再以 12,000 rpm 離心 15 mins 取上清液，於 40℃震盪 (含其後所稱震盪皆為 50 rpm 水浴) 15 mins 成酶萃取液，取 0.25 mL 萃取液加入含 60 mM L-苯丙氨酸之硼酸緩衝液為反應液 2.75 mL，於 40℃震盪 1 hr，之後加入 6N HCl 0.1 mL 終止反應。反應液以分光光度計 (日本島津公司出品，型號 UV-1601) 測定 290 nm 吸光值。以含 60 mM L-phenylalaninein 之硼酸緩衝液 3 mL 及 6N HCl 0.1 mL 之溶液為空白做為活性比對，PAL 活性以每小時每克鮮重之測定值 $OD_{290}\, h^{-1} \cdot g^{-1}$ 表示。

多酚氧化酶及過氧化酶活性分析：二種酶之萃取方法按 Lee 和 Smith (1979) 所述，修正為秤取 1 g 樣品，於冰浴中加入海砂及磷酸緩衝溶液 (phosphate buffer; 0.1 M, PPO 測定所用者為 pH 7.4，POD 測定所用者為 pH 6) 5 mL 進行研磨，其過濾、離心取上清液備用步驟如前述 PAL 方法。測定 PPO 活性時，以磷酸緩衝溶液 1.9 mL 加入 0.5 M 兒茶酚 0.2 mL，於 25℃震盪 15 mins 以穩定溫度製成反應液，加入前述製備之上清液 0.1 mL，以分光光度計測定 420 nm 吸光值。POD 活性之測定則按 Johnson 和 Cunningham (1979) 所述，修正為反應基質以含 3.6 mM 創癒木酚之磷酸緩衝液 2 mL，加入蒸餾水 0.4 mL 及 13.5 mM 之 H_2O_2 0.2 mL，於 25℃震盪 15 mins 以穩定溫度製成反應

液，加入前述製備之上清液 0.1 mL 震盪 3 mins，再以分光光度計測定 470 nm 吸光值。二種酶測定時皆以其反應液爲空白組做爲比對標準，PPO 及 POD 活性分別以其樣品組比對空白組在 OD_{420} 及 OD_{470} 波長下 1 min 內的數値變化量，並分別以每分鐘每公克鮮重之 OD_{420} 增加量 $\Delta OD_{420}\ min^{-1} \cdot g^{-1}$ 及 OD_{470} 變化量 $\Delta OD_{470}\ min^{-1} \cdot g^{-1}$ 表示。

結　　果

採收方式對果實內部褐化程度及櫥架壽命之影響

鳳梨果實採收後，在 24 hrs 內運抵實驗室時，徒手摘取果實之果梗傷口不平整，並已褐化，鐮刀割取之果梗則切面平整完好，經 25 ± 2℃ 櫥架放置 4 天，徒手摘取之果實縱切面，目視可見果梗傷口褐化已蔓延至基部果心處，而鐮刀割取之果實在外觀上無明顯異常。果實在 12.5 ± 2℃冷藏 1 週及 25 ± 2℃下櫥架 4 天，徒手摘取之果實基部果心與果梗接合處組織已呈現褐化水浸狀，並由基部向頂部蔓延而影響果實內部之外觀，內部褐化達 3.8 級。冷藏時間延長至 2 週再經 25 ± 2℃櫥架 4 天，則所有徒手摘取果實之內部褐化症狀皆已達 5.8 級，故評定爲喪失櫥架壽命。鐮刀割取之果實，在 12.5 ± 2℃下冷藏，果心部褐化程度隨時間之延長而增加，且果實冷藏後再經 25 ± 2℃櫥架 4 天，將使內部褐化程度稍增；唯即使經 4 週冷藏後在 25 ± 2℃下櫥架 4 天，其內部褐化面積仍未達第 4 級 (圖 1)，似仍具販售價值。

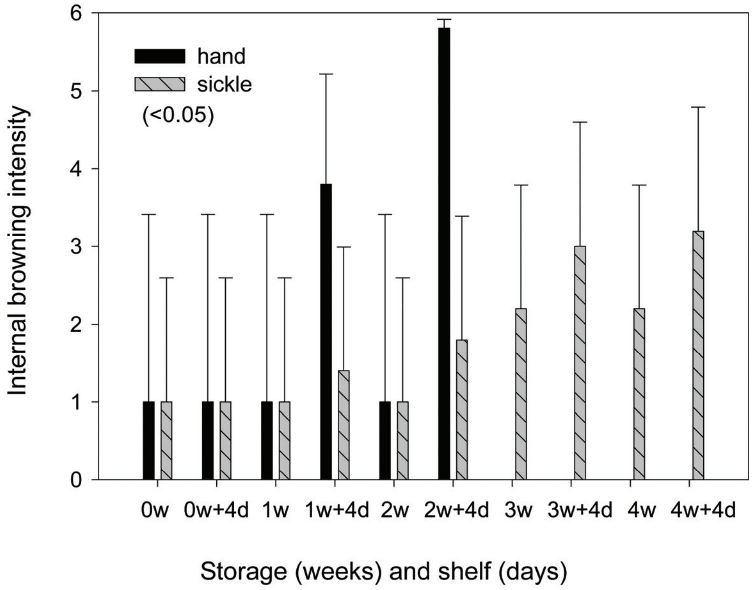


圖 1. 採收方式及冷藏對 '台農 17 號' 鳳梨冷藏於 12.5℃及在 25℃櫥架 4 天後果實內部褐化之影響。

Fig. 1. Effects of harvesting methods and storage temperature and time on internal browning of pineapple fruits (cultivar TN 17). w= weeks of storage in cold room at 12.5℃; d= days of storage on shelf at 25℃ . Note the significant differences in intensity of internal browning of pinapple fruits between hand-harvest and sickle-harvest fruits in the treatments of 1w + 4d and 2w + 4d.

採收方式對果實酶活性之影響

運抵實驗室當天，徒手摘取之果實 PAL 活性為 0.71 OD_{290} hr^{-1} · g^{-1} FW，顯著高於鐮刀割取果實之 0.49 OD_{290} hr^{-1} · g^{-1} FW，經 25 ± 2℃下櫥架 4 天，二採收方式之 PAL 活性皆呈現增加情形，分別為 0.85 及 0.53 OD_{290} hr^{-1} · g^{-1} FW (表 1)。徒手摘取之果實 PPO 活性僅較鐮刀割取果實稍高，且未達顯著差異，至於 POD 活性則無明顯差異。不論採收方式為何，鳳梨果實 PAL 活性隨冷藏時間延長而增加，櫥架後之情形亦同，唯徒手摘取之果實，在經 2 週冷藏及 25 ± 2℃下櫥架 4 天後，其活性不會再增加。此外，不論冷藏期間為何及是否經過櫥架，徒手摘取之果實 PAL 活性皆較鐮刀割取之果實高，顯示徒手摘取會使果實之 PAL 活性增加 (表 1、表 2)。

表 1. 採收方式對 '台農 17 號' 鳳梨果實冷藏於 12.5℃及在 25℃櫥架 4 天後 PAL 活性之影響

Table 1. Effects of harvesting methods on phenylalanine ammonia lyase (PAL) activities of pineapple fruits (cultivar TN 17) in postharvest storage.

Storage temperature (℃) and period (d)^z	PAL activity (OD290 · hr^{-1} · g^{-1} FW)	
	Hand-harvest	Sickle-harvest
25℃ 0 d	0.71 c^y A^x	0.49 c B
25℃ 4 d	0.85 bc A	0.53 c B
12.5℃ 7 d	0.86 bc A	0.51 c B
12.5℃ 7 d + 25℃ 4 d	0.97 b A	0.64 b B
12.5℃ 14 d	1.16 a A	0.72 b B
12.5℃ 14 d + 25℃ 4 d	1.13 a A	0.86 a B

^{z} 25℃ = storage temperature on shelf; 12.5℃ = storage temperature in cold room.
^{y} LSD:--abc for storage temperature and period. Means in each column with the same letter are not significantly different (P≦0.05) by Duncan's multiple range test.
^{x} LSD:--AB for different harvest methods (hand-harvest and sickle-harvest) with the same letter are not significantly different (P≦0.05) by Duncan's multiple range test.

表 2. 採收方式對 '台農 17 號' 鳳梨果實冷藏於 12.5℃及在 25℃櫥架 4 天後 POD 活性之影響

Table 1. Effects of harvesting methods on peroxidase (POD) activities of pineapple fruits (cultivar TN 17) in postharvest storage.

Storage temperature (℃) and period (d) ^{z}	POD activity (ΔOD_{470} · min^{-1} · g^{-1} FW)	
	Hand-harvest	Sickle-harvest
25℃ 0 d	5.71 a ^{y} A^x	6.23 ab A
25℃ 4 d	5.69 a A	6.29 ab A
12.5℃ 7 d	5.55 a A	5.18 bc A
12.5℃ 7 d + 25℃ 4 d	4.88 a A	4.30 c A
12.5℃ 14 d	3.86 b B	7.08 a A
12.5℃ 14 d + 25℃ 4 d	4.97 a A	3.94 c A

^{z} 25℃ = storage temperature on shelf; 12.5℃ = storage temperature in cold room.
^{y} LSD:--abc for storage temperature and period. Means in each column with the same letter are not significantly different (P≦0.05) by Duncan's multiple range test.
^{x} LSD:--AB for different harvest methods (hand-harvest and sickle-harvest) with the same letter are not significantly different (P≦0.05) by Duncan's multiple range test.

徒手摘取及鐮刀割取之鳳梨果實，未貯藏前 PPO 活性分別爲 2.93 及 2.35 $\Delta OD_{420}\ min^{-1}\cdot g^{-1}$ FW，在 25 ± 2℃下櫥架 4 天，則徒手摘取者降爲 2.64 $\Delta OD_{420}\ min^{-1}\cdot g^{-1}$ FW，但鐮刀割取者活性增爲 3.11 $\Delta OD_{420}\ min^{-1}\cdot g^{-1}$ FW。經 12.5 ± 2℃貯藏 1 週，活性皆略爲降低，唯徒手摘取者 PPO 活性仍顯著高於鐮刀割取者。冷藏 1 週加 4 天櫥架，徒手摘取之 PPO 活性持續降低，而鐮刀割取者之 PPO 活性則仍增高。貯藏期延長至 2 週，則徒手摘取者之 PPO 活性仍呈降低趨勢，直到貯藏 2 週加 4 天櫥架後，此處理之果實 PPO 活性才不降反升，而鐮刀割取之果實則無此情形 (表 3)。冷藏時間延長也使 POD 活性降低，徒手摘取之果實自開始試驗當日所測得之 5.71 $\Delta OD_{470}\cdot min^{-1}\cdot g^{-1}$ FW，經冷藏 1 週、冷藏後櫥架 4 天、冷藏 2 週等逐漸降低至其原活性的 0.68，直到經 2 週冷藏加櫥架 4 天後，活性又再增加。而利用鐮刀割取之果實，冷藏亦使其 POD 活性降低，冷藏後再經 4 天櫥架，亦同樣呈現活性降低之情形 (表 2)。

討　論

採收方式對果實內部褐化程度及櫥架壽命之影響

以徒手摘取鳳梨果實之果梗在經 1 天運輸後，不平整之傷口上已呈褐化，但鐮刀割取之果梗則仍平整而尚未呈現顏色之改變。徒手摘取之果實 PAL 活性顯著高於鐮刀割取之果實，PPO 活性僅稍高於鐮刀割取之果實，且差異未達顯著水準，POD 活性似與採收方式無關 (表 1、表 2 及表 3)。果實在 25 ± 2℃櫥架 4 天後，徒手摘取之果實果心已呈現褐化，而鐮刀割取之果實則無明顯異常。經 12.5 ± 2℃冷藏再經 25 ± 2℃櫥架 4 天，則徒手摘取之果實已因褐化及水浸狀等異常而影響外觀，但鐮刀割取之果實似仍具商品價値。

表 3. 採收方式對 '台農 17 號' 鳳梨果實冷藏於 12.5℃及在 25℃櫥架 4 天後 PPO 活性之影響

Table 1. Effects of harvesting methods on polyphenol oxidase (PPO) activities of pineapple fruits (cultivar TN 17) in postharvest storage.

Storage temperature (℃) and period (d) [z]	PPO activity ($\Delta OD_{420}\cdot min^{-1}\cdot g^{-1}$ FW)	
	Hand-harvest	sickle-harvest
25℃ 0 d	2.93 a [y] A[x]	2.35 bc A
25℃ 4 d	2.64 ab A	3.11 ab A
12.5℃ 7 d	2.19 bc A	1.59 c B
12.5℃ 7 d + 25℃ 4 d	1.49 c A	2.03 c A
12.5℃ 14 d	1.69 c B	3.42 a A
12.5℃ 14 d + 25℃ 4 d	1.91 c A	1.67 c A

[z] 25℃= storage temperature on shelf; 12.5℃= storage temperature in cold room.
[y] LSD:--abc for storage temperature and period. Means in each column with the same letter are not significantly different (P≦0.05) by Duncan's multiple range test.
[x] LSD:--AB for different harvest methods (hand-harvest and sickle-harvest) with the same letter are not significantly different (P≦0.05) by Duncan's multiple range test.

採收時留取較長果梗，俟集貨場作業時再進行果梗切齊處理，可使 Queen 系統 'Mauritius' 品種之鳳梨果實，在 10℃冷藏 2 週後仍保有 90%正常果實 (Wijleratnam *et al*. 1993)，亦可使以貯運性較 Queen 系更佳的 Spanish 系 (Nakasone & Paull 1999) 爲父本之 'N36' 品種之果實，在 8℃冷藏 3 週再經 20℃下櫥架 3 天，仍未呈現果心褐化。反觀徒手摘取致使 12℃冷藏 2 週之鳳梨果實呈現果心輕微褐化 (Zhou & Tan 1997)，甚且可能使冷藏於 12℃ 1 週再經 7 天櫥架的果實，果心褐化發生率超過 70%，且冷藏期延長至 2 週再經 7 天櫥架，則果心褐化發生率超過 90% (Paull & Rohrbach 1985)。本試驗中有相同的結果，徒手摘取果實在 12.5 ± 2℃冷藏 2 週再經 25 ± 2℃櫥架 4 天，外觀已呈異常，但鐮刀割取之果實似仍具商品價值。

採收方式對鳳梨果實酶活性之影響

徒手摘取之鳳梨果實經 2–4 週冷藏後，下半部已呈褐化症狀之部位，其 PAL 活性、兒茶酚、綠原酸 (chlorogenic acid) 及咖啡酸等含量，顯著較未顯現褐化之上半部高 (Zhou & Tan 1997)，此與本試驗得知，徒手摘取將促使果實 PAL 活性增加之結果相符。PAL 爲植物對逆境反應之關鍵角色 (Dixon & Paiva 1995; Holger & Schulz 2004; Saltveit 2000)，創傷會誘導 PAL 活性增加，並因此重新合成新生酚類物質，而這些新生酚類物質與原存於液胞中之可溶性酚類物質，皆可造成果實褐化 (Lichter *et al*. 2000)。因此，本試驗之果實經櫥架 4 天，PAL 活性較試驗當日採收者增加，而以徒手摘取之果實在 12.5 ± 2℃冷藏 1 及 2 週其活性分別增加 21.1%及 63.4%，而鐮刀割取之果實僅分別提高 4.1%及 46.9%，顯示採收時因握緊果實並折取，且造成創口不平整之創傷，較鐮刀割取時不直接施力於果實且傷口平整，與 PAL 活性及果心褐化有關。

鳳梨果實組織內 PPO 活性隨冷藏時間之延長而提高，亦隨果心褐化程度之增加而增加 (Stewart *et al*. 2001; Zhou *et al*. 2003)，但移回常溫後則又降低。本研究之鳳梨果實經冷藏 1 週再經櫥架 4 天，甚至冷藏時間延長至 2 週，果實 PPO 及 POD 活性皆呈降低趨勢，僅冷藏 2 週再經 4 天櫥架後，PPO 及 POD 活性不降反升，而鐮刀割取之果實則 PPO 及 POD 活性皆呈降低趨勢。Zhou 等所採用者爲開英種 (Smooth Cayenne)，分析部位爲果肉，而本研究採用國內自行選育之 '台農 17 號' 鳳梨果實，且分析部位爲果心組織，推測此差異可能導致分析結果之不同。再者，PPO 爲果實酵素性褐變的關鍵酵素 (Mater 1987)，當組織褐化時其活性增加，而本研究之採樣時機爲冷藏後取出立即採樣，或置於 25 ± 2℃櫥架 4 天後再採樣，是否因採樣時機之差異而造成結果略有不同，需進一步釐清。此外，徒手摘取之果實在 12.5 ± 2℃冷藏加 25 ± 2℃櫥架 4 天後，果實之 PAL 活性已不再呈增加趨勢，然 PPO 及 POD 活性卻反而增加，是否肇因於果實內部出現某種生理變化，亦有待深入探討。

誌　謝

本研究承蒙行政院農業委員會 96 農科-4.2.2-農-C4 計畫補助經費、農糧署 94 農科-1.3.2-糧-Z1 及 95 農科-1.3.2-糧-Z1 計畫補助經費，本所嘉義試驗分所官青杉先生及屏東縣瑪家鄉吳堅銘先生協助試驗始得以完成，謹此誌謝。

引用文獻 (Literature cited)

Wang, Y. Y., K. J. Huang, C. H. Tang, and T. C. Lee. 2004. The investigation of the injury to the pineapple fruits during plucking and the process of centralizing fruits. p.93–104. *in* the Research and development of pineapple in Taiwan. National Chiayi Univ. Chiayi, Taiwan. (in Chinese with English abstract)

Berardinelli, A., V. Donati, A. Giunchi, A. Guarnieri, and L. Ragni. 2004. Damage to pears caused by simulated transport. J. Food Eng. 66:219–226.

Van Canneyt, T., E. Tijskens, H. Ramon, R. Verschoore, and B. Sonck. 2004. Development of a predictive tissue discolouration model based on electronic potato impacts. Biosys. Eng. 88(1):81–93.

Dixon, R. A. and N. L. Paiva. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. Plant Cell 7:1085–1097.

Holger, R. and G. E. Schulz. 2004. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia lyase. Plant Cell 16:3426–3436.

Lichter, A., O. Dvir, I. Rot, M. Akerman, R. Regev, A. Wiesblum, E. Fallik, G. Zauberman, and Y. Fuchs. 2000. Hot water brushing: An alternative method to SO_2 fumigation for color retention of litchi fruits. Postharvest Biol. Technol. 18:235–244.

Lippert, F. and M. M. Blanke. 2004. Effect of mechanical harvest and timing of 1-MCP application on respiration and fruit quality of European plums *Prunus domestica* L. Postharvest Biol. Technol. 34:305–311.

Nakasone, H. Y. and R. E. Paull. 1999. Pineapple. p.292–327. *in:* Tropical Fruits. CAB intl. USA. 445 pp.

Paull, R. E. and K. G. Rohrbach. 1985. Symptom development of chilling injury in pineapple fruit. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110:100–105.

Stewart, R. J., B. J. B. Sawyer, C. S. Bucheli, and S. P. Robinson. 2001. Polyphenol oxidase is induced by chilling and wounding in pineapple. Aust. J. Plant Physiol. 28:181–191.

Studman1, C. J. and M. Geyer. 2002. Modelling the load distribution of stacked apples and other spherical objects. Biosys. Eng. 82(1):65–72.

Wijeratnam, R. S. W., M. Aceyesakere, and P. Surjani. 1993. Studies on black heart disorder in pineapple verieties grown in Sri Lanka. Acta Hortic. 433:317–323.

Zhou, Y. and X. Tan. 1997. Mechanism of blackheart development induced by low temperature and gibberellic acid in pineapple fruit. Acta Hortic. 425:587–593.

Zhou, Y., J. M. Dahler, S. J. R. Underhill, and R. B. H. Wills. 2003. Enzymes associated with blackheart development in pineapple fruit. Food Chem. 80:565–572.

Studies on Fruits Internal Browning of Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) by Harvest Method [1]

Pai-Chi Syue[2], Chia-Hui Tang[3], and Tan-Cha Lee[2,4]

Abstract

Syue, P. C., C. H. Tang, and T. C. Lee. 2008. Studies on fruits internal browning of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) by harvest method. J. Taiwan Agric. Res. 57:205–212.

Although both hand-harvest and sickle-harvest methods are used for harvesting pineapple fruits in Taiwan, the hand-harvest method is more popular than the sickle-harvest method. However, unlike the smooth cutting surface of the fruit stem by sickle-harvesting, pineapple fruits harvested by hands often resulted in uneven breaks of the stem, creating large wounds with rough surface and, thereby, reduced storage or shelf-life of the harvested produce. Results of this study showed that all the hand-harvested pineapple fruits stored at cold room (12.5℃) for 2 weeks and then moved them onto shelf (25℃) for 4 days, developed severe internal browning of fruit tissues (browning intensity index of 5.8 or >51% of browning tissues) and of no market values; whereas the internal browning of the sickle-harvested fruits was mild (browning intensity index of 2.0 or 3-5% of browning tissues) for the same storage period and conditions. The phenylalanine ammonia lyase (PAL) in harvested pineapple fruits increased with time of storage but the level of PAL in hand-harvested fruits was significantly higher than sickle-harvested ones. The polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD) in pineapple fruits decreased with time of storage but there was no significant difference between hand-harvest and sickle-harvest treatments.

Key words: Hand-harvesting, Sickle-harvesting, Phenylalanine ammonia lyase, Polyphenol oxidase, Peroxidase, Internal browning.

---

1. Contribution No.2328 from Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: September 3, 2008.
2. Former graduate student and professor, Department of Horticultural Science, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.
3. Assistant Researcher, Chiayi Agricultural Experiment Station, ARI., Chiayi, Taiwan, ROC.
4. Corresponding author, e-mail: tclee@mail.ncyu.edu.tw; Fax: (05)2753295.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 57(3):213–229 (2008)

愛文芒果 (*Mangifera indica* L. cv. Irwin) 類胡蘿蔔素生合成基因在果實發育時期之基因表現分析與選殖[1]

李文立[2] 邱國棟[2] 林榮貴[2] 陳福旗[3,4]

摘　　要

李文立、邱國棟、林榮貴、陳福旗。愛文芒果 (*Mangifera indica* L. cv. Irwin) 類胡蘿蔔素生合成基因在果實發育時期之基因表現分析與選殖。台灣農業研究 57:213–229。

本研究利用快速增殖 cDNA (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 技術，從愛文芒果果皮之訊息 RNA (mRNA) 中選殖類胡蘿蔔素 (phytoene desaturase, PDS) 基因之互補 DNA (cDNA) 以瞭解其果實發育期間色素基因表現情形。*PDS* 基因全長為 1,882 bp，包含一個長達 1,644 bp 的解讀框架 (open reading frame, ORF) 可轉譯成 548 個胺基酸，5'及 3'端未轉譯區 (untranslated region, UTR) 分別為 36 bp 及 202 bp，由序列比對分析結果顯示，該基因的胺基酸序列與其他植物物種具有 50.0–74.1%的相似性。*PDS* 基因經逆轉錄及 DNA 擴增後利用管家基因 (housekeeping gene) *actin* 之相對表現量，偵測其在不同果實發育時期之相對表現量，顯示愛文芒果 *PDS* 基因在果實發育期間為穩定表現之基因，*PDS* 基因從幼果期至黃熟果均有表現，與 *actin* 基因的相對表現量在幼果期 (stage 1) 最高，隨著果實發育，該基因的表現量呈現降低的趨勢。而果實在成熟過程中，總胡蘿蔔素的含量會在果實達到生理成熟期後才會快速地大量增加，而該基因的表現量卻未隨總胡蘿蔔素的增加而增加，顯示在果實後熟過程中，*PDS* 基因並未對類胡蘿蔔素生成有直接的影響。由於在果實發育過程中，芒果 *PDS* 基因的表現量呈現下降之趨勢，該基因的表現模式應為負調節 (down-regulated) 方式。

關鍵詞：芒果、類胡蘿蔔素、八氫茄紅素去氫酶、基因選殖。

前　　言

類胡蘿蔔素 (carotenoids) 廣泛分布於生物體，包含所有利用葉綠素進行光合成的生物體、某些非光合作用的細菌及多種真菌類。就光合成的植物而言，類胡蘿蔔素是必需的物質，它具有抗氧

---

1. 行政院農業委員會農業試驗所農業研究報告第 2329 號。接受日期：97 年 9 月 10 日。
2. 本所鳳山熱帶園藝試驗分所助理研究員、助理研究員及副研究員。台灣 高雄縣 鳳山市。
3. 屏東科技大學植物科學研究所教授。台灣 屏東縣。
4. 通訊作者，電子郵件：fchen@mail.npust.edu.tw；傳真機：(08)7740371。

化的功能，可保護處在單一氧分子、過氧化狀態或是光氧化 (photo-oxidation) 的葉綠素，而且類胡蘿蔔素也是植物相當重要的色素物質，雖然在自然界中提供各種色彩的物質以類黃酮 (flavonoids) 化合物為主，但類胡蘿蔔素亦提供紅、黃、橙等色彩，以吸引動物幫助植物花粉及種子的傳播 (Li *et al.* 2001)。此外，類胡蘿蔔素為人類維他命 A 的前驅物質，對人類的健康具有相當重要的地位，國際上對此議題之研究報告頗多。類胡蘿蔔素在畜牧生產上同樣具有重要地位，常做為畜產動物飼料的重要營養添加物，以幫助畜產動物增進健康及產量，並可做為食品加工業的天然著色劑 (Klaui & Bauernfeind 1981)。一般而言，類胡蘿蔔素由 40 個碳的八氫茄紅素 (phytoene) 起始進行合成，而 phytoene 則由兩個含 20 碳分子的前驅物牻牛耳基牻牛耳基焦磷酸 (geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP) 產生，由 GGPP 合成為 phytoene 的過程係由八氫茄紅素合成酶 (phytoene synthase) 參與前驅物的合成，之後藉由八氫茄紅去氫酶 (phytoene desaturase) 的作用加入 6 個額外的雙鍵，產生 ζ-胡蘿蔔素 (ζ-carotene) 及其異構物，在此生合成過程中，使無色的 phytoene 轉變為淡黃色的 ζ-carotene，再經過另一次的去飽和 (desaturation) 作用，將黃色的 ζ-carotene 轉換為紅色的茄紅素 (lycopene)，再藉由環化酶 (cyclase) 的作用，即可轉化成 β 胡蘿蔔 (β-carotene) 而表現出更鮮豔的顏色 (Vishnevetsky 1999; Sandmann 2001)。此外，類胡蘿蔔素與植物荷爾蒙 GA 與 ABA 的生合成有密切相關，係影響植物高矮、形態發育與逆境反應的重要前驅物質 (Sandmann 2001) (圖 1)。

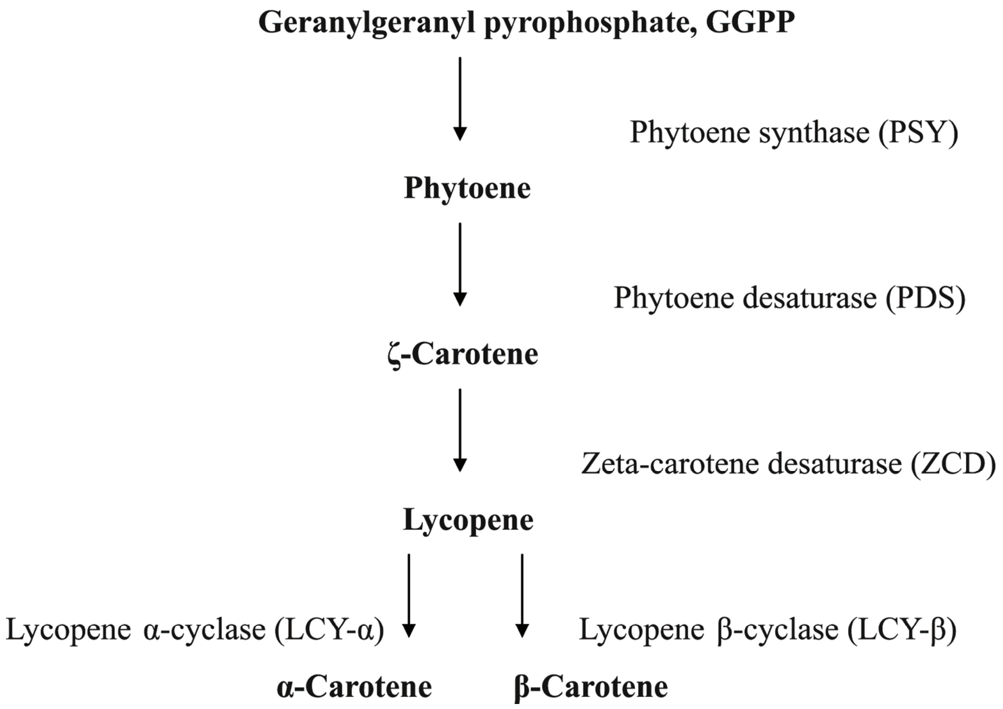


圖 1. 植物類胡蘿蔔素的生合成途徑。

Fig. 1. The carotenoid biosynthetic pathway in plants.

依據農委會統計資料，2007 年台灣芒果的栽培面積廣達 18,375 ha，年產量達 215,291 t，是重要的熱帶經濟果樹之一，特別是台灣南部，台南、高雄及屏東等縣，佔栽培總面積的 95%，目前以愛文 (*Mangifera indica* L. cv. Irwin) 爲主要的栽培品種。爲了探討類胡蘿蔔素生合成相關基因在芒果果實發育過程扮演的角色，並瞭解該基因表現與調節機制，本文以愛文芒果爲材料，進行類胡蘿蔔素生合成途徑前期重要關鍵酵素 phytoene desaturase (PDS) 基因之選殖與表現之研究。該基因是類胡蘿蔔素生合成過程中，將無色的 phytoene 催化成淡黃色 ξ-carotene 的關鍵酵素，本研究選殖愛文芒果 PDS 基因並進行基因結構的解析，探討其在不同果實發育時期的 mRNA 相對表現量變化，期待將來能夠利用該基因做爲調控芒果果實中類胡蘿蔔素的生合成量，以改變果肉顏色或增加胡蘿蔔素含量之用。

材料與方法

植物材料

愛文種芒果取自農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所之母樹園，其栽培管理按慣行方法進行。在開花結果後，以果實直徑 3 cm 之幼果做爲萃取 RNA 及基因選殖之材料，並依據果實大小，分別以果實直徑 3 cm (stage 1)、果實直徑 5 cm (stage 2)、果實直徑 7 cm (stage 3)、果實直徑 9 cm (stage 4)、果實綠熟 (stage 5) 與果實黃熟期 (stage 6) 等 6 個取樣時期分別取樣，另取樣成熟葉片，做爲不同果實發育期間與葉片基因表現量分析之材料 (圖 2)。

圖 2. 本研究所使用之植物材料。A.不同發育時期的愛文芒果果實外觀；B.果實內部剖面及果肉顏色。(標尺長度爲 3 cm)

Fig. 2. Surface appearance (A) and flesh color (B) of mango fruits, cv. Irwin, at the six development stages (left = statge 1; right = statge 6). Note differences in fruit size and color at different stages. (bar = 3 cm).

PCR 引子之設計與合成

從美國 NCBI 網站 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) 資料庫中收集已經發表之 14 種植物，包含黑藻 (*Hydrilla verticillata*, AAT76434.1)、萬壽菊 (*Tagetes erecta*, AAG10426.1)、葡萄柚 (*Citrus* × *paradise*, AAK51545.1)、龍膽花 (*Gentiana lutea*, BAB82461.1) 及阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*, AAL15300.1) 等之 PDS 蛋白質序列，利用 Omiga 2.0 軟體 (Oxford Molecular Ltd.) 分析不同物種中，該基因之胺基酸保留區域做爲合成退化引子 (degenerate primer)，PDS (forward)及 PDS (reverse)，並依據此引子對複製愛文芒果幼果 *PDS* 基因之片段 (表 1)。

總量 RNA 之抽取

將約 100 mg 果肉置研缽內，以適量液態氮使之冷凍，研磨成粉末。加入 TRIZOL (Invitrogen) 1 mL 組織混合均勻，於 4℃離心 10 mins 後，取上澄液，加入三氯甲烷 (Chloroform, TRIZOL 試劑的 0.5 倍量)，劇烈搖晃，離心管 1 min 後，於室溫靜置 3 mins，4℃離心後，取上澄液。加入異丙醇 (TRIZOL 試劑的 0.5 倍量)，靜置 10 mins 後，於 4℃離心 10 mins 後，去上澄液，乾燥後，溶於焦碳酸二乙酯 (DEPC, diethyl pyrocarbonate) 處理過的無菌水，並以光電比色計及瓊脂膠電泳檢測 RNA 的濃度與品質。

cDNAs 之合成

cDNAs 的合成係以 SMART^{TM} PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, California, USA) 進行，方法簡述如下：總量 RNA (0.5 µg) 爲模版，SMART II (10 µM) 及 3' CDS (10 µM) 寡核甘酸引子 (oligonucleotide) 各 1 µL，加去離子水調至 5 µL，於 70℃作用 2 mins 後短暫離心，加入 2 µL 5X first-strand buffer、1 µL DTT mix (20 mM) 與 1 µL dNTP mix (10mM)，以及 200 單位的 Superscript II MMLV，於 42℃合成單股 cDNAs 1 hr。取 2 µL 的單股 cDNAs 爲模版，混以 4 µL 的 5' PCR Primer (10 µM)、10 µL 的 10X Advantage 2 PCR Buffer (Clontech, California, USA)、

表 1. 利用 NCBI 資料庫已發表之數種植物胺基酸序列設計之退化引子及本研究中所使用之引子序列

Table 1. Degenerate primers and other primer pairs were used in this study

Primer Name	Sequences of primers
PDS1 (forward)	5'-TAY GGN YTN GCN GGN YTN TC-3'[z]
PDS2 (reverse)	5'-ARR ATY TTN GCY TTN GAY TG-3'
GSP1 (forward)	5'-GGA ACC ATG CTT CTC CTG GAA G-3'
GSP2 (reverse)	5'-AGC TCC TGT AAA TGG AAT ATT G-3'
SMART II	5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CGC GGG-3'
3' RACE CDS	5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CGC GGG-3'
5' RACE CDS	5'-(T)$_{25}$N$_{-1}$N-3'
UPM-long	5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA TCA ACG CAG AGT-3'
UPM-short	5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'
NUP	5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3'
*actin*1 (forward)	5'- AGT TGA ACC TCC ACT GAG CAC-3'
*actin*2 (reverse)	5'-GGG CAC CTG AAC CGC TCG GCT CC-3'

[z] Y=C,T; W=A,T; D=A,G,T; R=A,G; V=A,C,G; H=A,C and M=A,C.

2 μL dNTP mix (10 mM)、80 及 2 μL Advantage 2 PCR Polymerase Mix (Clontech, California, USA) 等，進行 LD (long distance) PCR 增殖雙股 (double-strand) cDNAs。條件爲 95℃變性 (denaturation) 1 min 及 24 個增幅反應：95℃變性 5 secs，65℃鍊合 (annealing) 5 secs 及 68℃延伸 (extension) 6 mins (ABI GeneAmp PCR system 2700)，最後以 1%膠體電泳檢測雙股 cDNAs 的品質。

PDS 片段之增殖

根據上述各基因之保守區域設計退化引子以選殖愛文芒果 *PDS* 基因的 cDNA 片段。以 100 ng 雙股 cDNAs 爲模版，加入 5 μL 的 2X PCR Mg-free buffer、3 μL $MgCl_2$ (25 mM)、4 μL dNTPs (2.5 mM)、退化引子 (2.5 μM) 各 4 μL 及 1.25 u 的 *Taq* DNA Polymerase (Promega, USA)，以無菌水調至 50 μL，混合均勻，進行 PCR。反應條件爲 94℃變性 2 mins 及 36 個循環：94℃變性 1 min，50℃鍊合 2 mins 及 72℃延伸 3 mins；再於 72℃延伸 10 mins 後，保存於 4℃直到電泳分析。

PCR 產物之純化

採用 QIAEX®II Gel Extraction 試劑 (Qiagen, USA) 純化 PCR 產物。自瓊脂電泳膠體中，以乾淨刀片切取預期分子量之 PCR 產物，每 0.1 g 膠塊，加入 300 μL 的 Buffer QX1。振動懸浮 30 secs，加入 10 μL QIAEXII。50℃加熱溶解瓊脂膠後，離心 30 secs (13,000 rpm)，移除上清液，以 500 μL Buffer QX1 清洗後，離心 30 secs，去上清液，500 μL Buffer PE 清洗 2 次，風乾至沉澱物呈白色。加 20 μL 無菌水洗提 DNA，供後續實驗之用。

PCR 片段的選殖

以 T4 ligase (pGEM-T Easy vector system，Promega, USA)，連接回收之 PCR 條帶於 pGEM-T Easy 選殖載體，並以熱休克法在 42℃下轉型至大腸桿菌 JM109 菌系的勝任細胞中，於含 40 mg/mL X-gal 及 IPTG 的 LB/ampicillin (100 μg/mL) 固態培養基，於 37℃培養 18–20 hrs。待菌落長出後，依藍白篩選法挑選白色菌落進行培養，抽取質體 DNA，以 *Eco*RI 切割或以 PCR 方式確認轉殖成功的殖系 (clone)。

質體的抽取及殖入片段的確認

質體的抽取係以 Viogene 公司的 Plasmid DNA Miniprep System 進行之。挑取單一白色菌落，於含 ampicillin 100 μg/mL 的 LB 培養液中，培養 18 hrs 後，依廠商建議之步驟，進行質體萃取。取 10 μL 質體 DNA 溶液，以限制酵素 *Eco*RI 於 37℃進行酵素剪切 40 mins，以 1%瓊脂膠電泳篩選含插入片段 DNA 的選殖系。確認之選殖系菌體委託明欣生物科技公司定序 (Mission Bi-tech, Taipei, Taiwan)。

cDNA 片段之序列比對及選殖系保存

將解序完成之 *PDS* 片段選殖系之 cDNA 序列與 NCBI 資料庫以 BLAST Analysis 程式進行比對，確定是否爲目標基因片段。已確認之片段可供快速擴增 cDNA 端點 (Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE) PCR 的 5'及 3'端專一性引子之設計，並做基因表現分析用。

快速擴增 *PDS* cDNA 端點

專一性引子之設計：依解序完成之 *PDS* 片段選殖系之 cDNA 序列以 Omiga 2.0 軟體進行最適引子區域分析設計高專一性引子 (GSP, gene specific primer)，GSP1 (forward) 及 GSP2 (reverse) (表 1)，供 RACE 反應使用。

PDS 5'及 3'端 cDNA 序列之選殖：5'及 3'端 cDNA 序列之選殖採用 Clontech 公司的 SMART^{TM} RACE cDNA Amplification 試劑進行，其步驟概要如下：分別以 3 µL total RNA 為模版，合成 5'-RACE-Ready cDNA 及 3'-RACE-Ready cDNA。將 3 µL total RNA、1 µL 5'-CDS primer 及 1 µL SMART II A oligo 於 0.2 mL 離心管內混合均勻，短暫離心後；70℃加熱 2 mins，於冰上冷卻 2 mins，短暫離心；加入 2 µL 5X first-strand buffer、1 µL 20 mM DDT、1 µL 10 mM dNTP Mix 及 1 µL PowerScript Reverse MMLV Transcriptase，反應體積為 10 µL，42℃下 1.5 hrs 後，70℃加熱 7 mins 終止反應後於-20℃凍藏。取 3 µL total RNA、1 µL 5'-CDS primer 及 1 µL 無菌水混合均勻，之後與 5'-RACE-Ready cDNA 合成步驟相同，逆轉錄合成單股 3'-RACE-Ready cDNA，並於 ABI PCR system 2700 以 5 個循環：94℃變性 10 secs 及 72℃鍊合及延伸 3 mins，5 個循環：94℃變性 10 secs、71℃鍊合 15 secs 及 72℃延伸 3 mins，最後 20 個循環的 94℃變性 10 secs、70℃鍊合 15 secs 及 72℃延伸 3 mins，完成後置於 4℃直至電泳分析。若 5'-、3'-RACE PCR 及 3'-RACE Nested PCR 產物與預期產物大小相當，則進行黏接反應、轉型作用、選殖系確認、序列解序及選殖系保存等工作。基因序列之排比以 Omiga 2.0 進行，各物種及芒果 PDS 基因序列系統分析 (phylogentic analysis) 以 DNAstar 套裝軟體 (DNASTAR, Inc. Madison, USA) 之 MegAlign 程式進行分析與繪圖。

總量類胡蘿蔔素的測定

果實與葉片總類胡蘿蔔量之測定依照 Lichtenthaler & Wellburn (1983) 所發表方法，依各成分比例降低至總體積減量為 2 mL 後進行萃取。其大要為秤取樣品後利用液態氮急速冷凍後在研缽內磨細，以 80%丙酮萃取色素並於 4,500 rpm 離心 5 mins 後，取上清液以 Hitachi U-2000 光譜儀 (spectrophotometer) 測定 $A_{663.6}$、$A_{646.6}$ 及 $A_{440.5}$ 的吸收值，計算葉綠素 a、葉綠素 b 及類胡蘿蔔素總量。

相對定量 RT-PCR

相對定量 RT-PCR 方法參照 Leblanc *et al*. (1999) 發表之相對定量方法，以 *actin* 基因為對照基因，分別進行 RT-PCR 反應後取 12.5 µL 進行電泳及 EthBr 染色，於紫外燈下照相後利用 AlphaImager 軟體 (Clontech, USA) 進行各個條帶亮度的分析，所得到的數據與 *actin* 基因條帶亮度比較，求得不同果實發育時期與成熟葉片 *PDS* 基因與 *actin* 基因之相對表現量，每個時期均重複進行 3 次 RT-PCR 及定量，所得數值以百分率表示，所得數據以 SigmaPlot 9.0 版軟體求得平均值與標準機差並繪圖。

結　果

愛文芒果 PDS cDNA 片段之選殖

芒果全株含有高量的多醣體及酚類化合物，在萃取核酸過程中容易產生褐化物，影響 DNA 或 RNA 的萃取效率，利用 TRIZOL 試劑可以簡單快速的分離到果實的總量 RNA，在仔細的操作下，可避免 DNA 的污染，利用該總量 RNA 進行逆轉錄複製 cDNA 在 22 至 24 次循環及鏈合溫度 68℃的 PCR 條件下，可以得到高產量且品質佳的 cDNA，供基因分離選殖試驗。

PDS cDNA 片段之增殖係以上述 cDNA 為模版，並依據多種已發表的植物 *PDS* 胺基酸保留區域設計之退化引子 PDS1 (forward)及 PDS2 (reverse)，於 55℃鍊合，32 個增幅反應後，增殖得長約

450 bp 的基因片段，該片段自電泳膠體中分離純化後，以 pGEM-T Easy 載體進行選殖並進行核酸序列解序。該基因片段經與 NCBI 基因庫收錄之核酸序列比對結果顯示，與葡萄柚 (*Citrus* × *paradise*, AF364515.1) *PDS* 基因核酸序列的一致性 (identity) 達 88%，與水稻 (*Oryza sativa*, AF049356) 比較則有 82%的一致性，此一結果顯示所選殖之片段確實爲芒果 *PDS* 基因部分序列。藉此已選殖獲知的芒果 *PDS* 片段序列進一步設計高專一性的引子，GSP1 (forward) 及 GSP2 (reverse) (表 1)，做爲選殖 *PDS* cDNA 3'端及 5'端所需之芒果 PDS 基因專一性引子對。

快速複製芒果 PDS 基因 cDNA5'及 3'端點及其全長選殖系

以 GSP2 及 UPM 引子於 70℃鍊合溫度條件下與 5' RACE-Ready cDNA 模版進行 RACE-PCR，5'端產物約爲 900 bp，另以 GSP1 及 UPM 引子與 3' RACE-Ready cDNA 模版鍊合，其 3' RACE 產物約爲 1.3 kb，而作爲正對照的 GSP1 及 GSP2 引子對，無論在 5'或 3' RACE-Ready cDNA 模版中均產生與預期片段 (400 bp) 大小相符的產物，顯示該兩股 cDNA 均含 *PDS* 基因片段，而負對照中單獨使用任一 GSP 或 UPM 引子在 5'端並未複製出背景條帶，但在 3'端則有一明顯的背景產物，此背景產物因與目標產物分子大小不同，並未造成干擾 (圖 3)。將此 5'端 900 bp 條帶與 3'端 1,300 bp 條帶，分別選殖後進行解序，序列經 DNAStar 軟體併接去除重複區域後得到 1,882 bp 之愛文芒果 *PDS* 全長 cDNA (圖 4)。並與目前已知的基因序列資料庫比對後，確定爲 *PDS* 基因無誤。

愛文芒果 *PDS* 基因之 cDNA 核酸序列與結構

愛文芒果 *PDS* 基因之 cDNA 序列全長爲 1,882 bp，編碼區 (coding region) 從 37 bp 處起至 1,680 bp 止，包含一個長達 1,644 bp 的解讀框架 (open reading frame, ORF) 可轉譯成 548 個胺基酸，5'端及 3'端未轉譯區 (untranslated region, UTR) 分別爲 36 bp 及 202 bp，由 DNA 序列比對分析結果顯示，該 cDNA 基因 DNA 序列與其他植物物種具有 78–87%的相似性，其中與柑橘屬的柚子

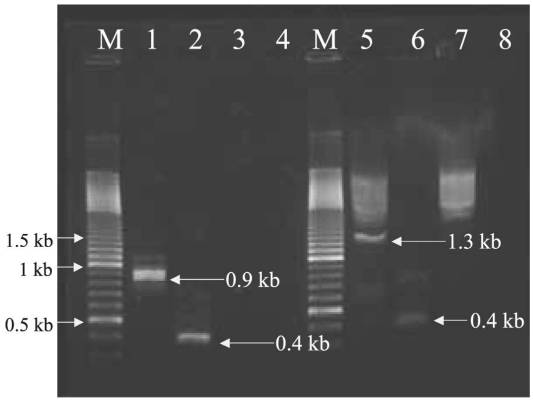


圖 3. 以快速增幅 cDNA 端點方式進行愛文芒果 PDS cDNA 選殖之電泳圖。

Fig. 3. The agarose gel of 3' and 5'-RACE-PCR products by using UPM, GSP1 and GSP2 primers. M. DNA ladder; 1. 5' RACE (UPM+GSP2 primer pair); 2. check 1 (GSP1+GSP2 primer pair); 3. check 2 (GSP2 primer only); 4. check 3 (UPM primer only); 5. 3'RACE (UPM+GSP1 primer pair); 6. check 4 (GSP1 +GSP2 primer pair); 7. check 5 (GSP 1 primer only); 8. check 6 (UPM primer only).

(*Citrus maxima*, EU798285.1)、柳橙 (*Citrus sinensis*, AJ319761.1) 及葡萄柚 (*Citrus* × *paradisi*, AF364515) 等有較高的相似度 (分別爲 87%、83%及 83%)，而與阿拉伯芥 (*Arabidopsis thalian*, L16237.1) 的相似度較低 (78%)。

愛文芒果與數種植物 *PDS* 基因之親緣關係

利用MegAlign程式中對愛文芒果與14種植物的PDS胺基酸序列進行叢群分析 (cluster method) (圖 5)，結果顯示愛文芒果 *PDS* 基因之胺基酸序列與其他植物差異性較大，單獨形成一群。其中與咖啡 (*Coffea canephora*, ABC87739.1) 最爲接近，相似度達 74.1%。其他 12 種植物被歸分爲一個大群，葡萄柚 (*Citrus* × *paradise*, AAK51545.1)、杏樹 (*Prunus armeniaca*, AAX33347.1) 及苦瓜 (*Momordica charantia*, AAR86105.1) 在這些物種中較爲接近，相似度爲 86.1%，被歸類爲同一群；萬壽菊 (*Tagetes erecta*, AAG10426.1)、菊花 (*Chrysanthemum* × *morifolium*, BAE79552.1) 與胡蘿蔔 (*Daucus carota*, ABB52082.1) 爲同一群；黑藻 (*Hydrilla verticillata*, AAT76434.1)、番紅花 (*Crocus sativus*, AAO24235.1)、阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*, AAL15300.1) 及水稻 (*Oryza sativa*, AAD02489.1) 爲一群，而煙草 (*Nicotiana benthamiana*, ABE99707.1)、馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*, AAS17750.1) 與龍膽花 (*Gentiana lutea*, BAB82461.1) 則單獨成爲一群。芒果 PDS 基因胺基酸序列與其他植物之相似度爲 50.0%至 74.1% (表 2)，顯示其基因演化變動較大。比對其高變化區域分別爲靠近前端的 38 個胺基酸與末端區域的 140 個胺基酸差異較大外，其餘胺基酸序列則具有較高的保守性 (圖 6)。

```
 -36                                                                   CTTCCAAAAAGTTCAGATTCTTTCACTAACAAATAA  -1
   1  ATGAGCTTCAACTTGAGCTTGTGTGGAAGTGCTTTAATGGCGTTTCAAGGGAGTGAATTGATGGGCMAGGCCATCAAATTTCACGTTAAAGCAACTCCAA  100
      M  S  F  N  L  S  L  C  G  S  A  L  M  A  F  Q  G  S  E  L  M  G  X  A  I  K  F  H  V  K  A  T  P  R
 101  GGAGCGGATATAAGCCTTTGCAGGTAGCTTGTGTGGACTATCCGAGACCAGATATTGATAATACAGCTAATTTCTTGGAAGCTGCTAAGTTGTCTTCTTC  200
        S  G  Y  K  P  L  Q  V  A  C  V  D  Y  P  R  P  D  I  D  N  T  A  N  F  L  E  A  A  K  L  S  S  S
 201  CTTTCGTGCTTCTGCTCGTCCTCCCAAGCCTTTGAAAGTTGTAATTGCTGGTGCAGGTTTGGCTGGTTTATCAACTGCAAAATATCTGGCAGATGCAGGC  300
       F  R  A  S  A  R  P  P  K  P  L  K  V  V  I  A  G  A  G  L  A  G  L  S  T  A  K  Y  L  A  D  A  G
 301  CACAAACCTTTGTTACTAGAAGCAAGAGATGTTCTAGGTGGAAAGGTAGCTGCCTGGAAAGACGATGATGGTGACTGGTATGAGACAGGCCTGCATATAT  400
      H  K  P  L  L  L  E  A  R  D  V  L  G  G  K  V  A  A  W  K  D  D  D  G  D  W  Y  E  T  G  L  H  I  F
 401  TTTTTGGGGCATACCCAAATGTRCAGAACCTGTTCGGAGAACTTGGTATCAATGACCGATTGCAATGGAAGGAGCACTCAATGATATTTGCAATGCCAAA  500
        F  G  A  Y  P  N  V  Q  N  L  F  G  E  L  G  I  N  D  R  L  Q  W  K  E  H  S  M  I  F  A  M  P  N
 501  CAAGCCCAGGAGAATTCCAGCCGATTTGATTTTCCAGAAGTTCTTGCCAGCTCCTGTAAATGGAATATTGGGCGAATTTGAAGGAATAATGAAAATGTTA  600
       K  P  R  R  I  P  A  D  L  I  F  Q  K  F  L  P  A  P  V  N  G  I  L  G  E  F  E  G  I  M  K  M  L
 601  ACTTGGCCCGAGAAAGTCAAGTTTGCTATTGGACTTCTTCCAGCAATGCTTGGTGGACAATCTTATGTTGAAGCCCAAGATGGTTTAACTGTCAAGGAAT  700
      T  W  P  E  K  V  K  F  A  I  G  L  L  P  A  M  L  G  G  Q  S  Y  V  E  A  Q  D  G  L  T  V  K  E  W
 701  GGATGATAAAGCAGGGAGTACCTGAGCGTGTGACAACAGAGGTGTTTTATTTCGCCATGTCAAAAGGGCACTYTAAATTTTTATTAAACCCATCATCAAA  800
        M  I  K  Q  G  V  P  E  R  V  T  T  E  V  F  Y  F  A  M  S  K  G  H  X  K  F  L  L  N  P  S  S  N
 801  TTGTCAAATGCAATGTATATTAATTGCTTTAAAATCGGATTTCTTCCAGGAGAAGCATGGTTCCAAGATGGCATTCTTAGATGGTAGTCCCCCAGAGAGA  900
       C  Q  M  Q  C  I  L  I  A  L  K  S  D  F  F  Q  E  K  H  G  S  K  M  A  F  L  D  G  S  P  P  E  R
 901  CTTTGTATGCCGATTGTTAATCACATTCAGTCGCTAGGTGGTGAAGTGCGACTAAATTCTCGGATACAGAAAATTGAGCTCAATAGTAATGGAACTGTGA  1000
      L  C  M  P  I  V  N  H  I  Q  S  L  G  G  E  V  R  L  N  S  R  I  Q  K  I  E  L  N  S  N  G  T  V  K
1001  AGAATTTCTTACTAACCAGTGGGGAAGTGATTGAAGGAGATGTTTATGTATTTGCCACTCCAGTTGACATCCTAAAGCTTCTTTTGCCTGAAAACTGGCA  1100
        N  F  L  L  T  S  G  E  V  I  E  G  D  V  Y  V  F  A  T  P  V  D  I  L  K  L  L  L  P  E  N  W  Q
1101  AGAGATGCCGTACTTCAAAAAATTGGAGAAATTGGTCGGAGTTCCAGTTATTAATGTTCACATATGGTTCGACAGGAAACTAAAAAACACATATGATCAT  1200
       E  M  P  Y  F  K  K  L  E  K  L  V  G  V  P  V  I  N  V  H  I  W  F  D  R  K  L  K  N  T  Y  D  H
1201  CTACTCTTCAGCAGAAGTCCTCTCTTGAGGTGCTGTACCGGCTTGACNAATGGYCCGGTAACCATGGTAAGGAAATTATTTCACAACCCCTTAACCCAAA  1300
      L  L  F  S  R  S  P  L  L  R  C  C  T  G  L  T  N  G  P  V  T  M  V  R  K  L  F  H  N  P  L  T  Q  I
1301  TCCCATGCGAAGAGGTTGGGTTTTTTGCCCCCCGCTCACGAAATGGATTCTCGGCGAAGCGACTCAGAAATAATGGATGCTACAATGAAGGAGCTTGCAA  1400
        P  C  E  E  V  G  F  F  A  P  R  S  R  N  G  F  S  A  K  R  L  R  N  N  G  C  Y  N  E  G  A  C  K
1401  AACTCTTTCCGGACGAAATTTCTGCTCATCAAAGCAAAGCAAAAATTGTTACGTATCATGTTGTTACAACGCCAAGGTCTGTGTACAAGACTGTCCCAAA  1500
       T  L  S  G  R  N  F  C  S  S  K  Q  S  K  N  C  Y  V  S  C  C  Y  N  A  K  V  C  V  Q  D  C  P  K
1501  TTGTGGACCTTGTCGTCCCCTGCAAAGATCTCCAATAGATGGATTCTATTTAGCTGGGGATTACACAAAACAGAAGTATCTGGCTTCAATGGAAGGTGCA  1600
      L  W  T  L  S  S  P  A  K  I  S  N  R  W  I  L  F  S  W  G  L  H  K  T  E  V  S  G  F  N  G  R  C  S
1601  GTGTTGTCAGGAAAGCTTTGTGTTCAAGCTATTGTACAGGACTATGAGGTGCTAGTTGCGCGATCAAAAGGAGAATTGGCTGAGGCAAACATTCGCTAAA  1700
        V  V  R  K  A  L  C  S  S  Y  C  T  G  L  *
1701  TACCCTTAAACAGGCAAGATGGTTGAAAGATTGATTGAGGATTGTGTAATGATGGAAATATTATTTTTTTTCAACTTATAAAAAGGAAAAATAATACTCA  1800
1801  GAATCTTCTATAGTGAATCTATTTCTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA                                                      1848
```

圖 4. 愛文芒果 *PDS* 全長 cDNA 及其轉譯後之胺基酸序列。

Fig. 4. *PDS* cDNA and peptide sequences of *Magifera indica* 'Irwin'. Start codon is in bold.

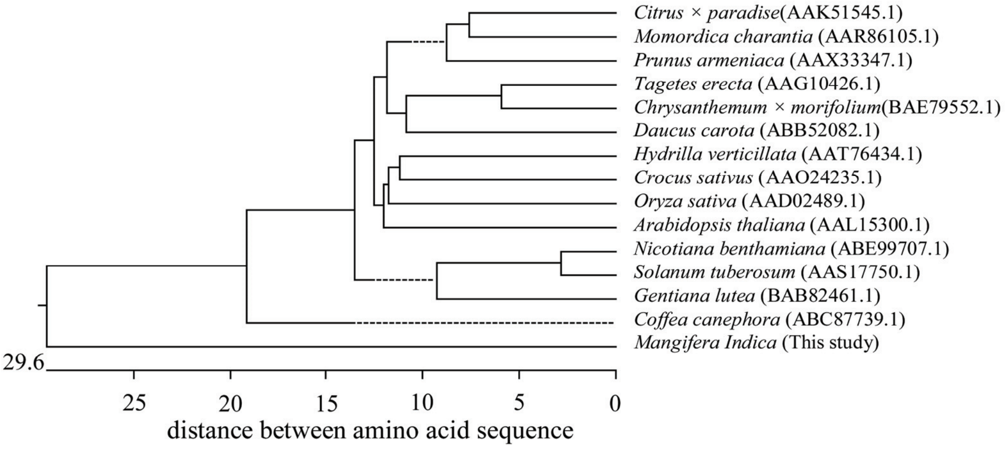


圖 5. 愛文芒果與數種植物 PDS 胺基酸序列之叢群分析圖。橫軸數字表示各分歧點物種胺基酸序列之差異性，虛線 (-) 表示負的分枝長度。

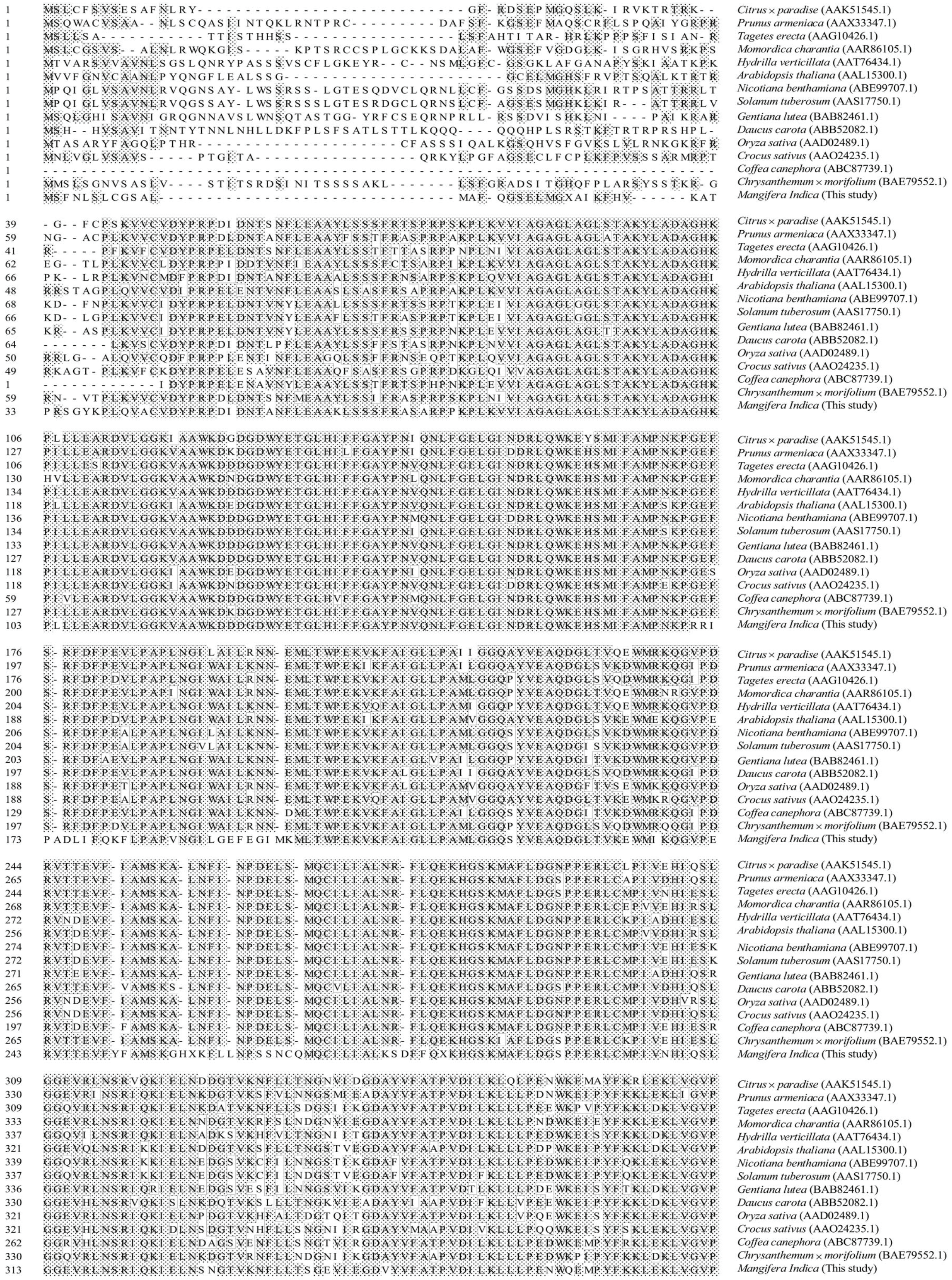
Fig. 5. Phylogenic relationship of PDS orthologs among *M. indica* 'Irwin' and 14 other plant species based on amino acid sequence. The length of each pair of branches represents the distance between amino acid sequence. Dotted lines (-) indicate a negative branch length.

表 2. 愛文芒果與 14 種已發表植物 PDS 胺基酸序列之相似度比較 [z]

Table 2. Sequence similarity (%) of Irwin mango (*Mangifera indica*) PDS proteins and other plant species [z]

NO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	100.0														
2	84.1	100.0													
3	80.8	81.1	100.0												
4	84.4	81.2	80.2	100.0											
5	81.7	78.5	80.2	79.5	100.0										
6	81.5	79.7	79.7	78.3	76.7	100.0									
7	81.9	81.0	81.7	78.8	79.0	79.5	100.0								
8	77.3	79.0	77.3	80.0	78.7	78.1	93.3	100.0							
9	81.5	79.9	80.0	77.6	77.6	78.3	82.1	81.6	100.0						
10	80.3	78.4	81.3	75.7	76.1	77.0	76.1	74.9	75.7	100.0					
11	78.6	77.0	77.1	77.2	78.6	78.4	76.5	76.0	76.3	75.4	100.0				
12	79.3	77.5	77.5	77.0	79.3	77.9	78.4	76.0	75.9	74.2	77.7	100.0			
13	86.6	86.1	86.9	85.0	85.8	84.1	89.1	88.6	89.4	84.4	83.8	84.4	100.0		
14	81.9	79.9	88.2	79.5	78.8	78.3	79.5	79.0	77.3	78.3	75.6	77.9	86.6	100.0	
15	55.7	53.5	52.4	53.8	52.9	52.7	51.8	52.4	51.5	51.3	51.3	50.0	74.1	52.4	100.0

[z] 1. *Citrus × paradise* (AAK51545.1). 2. *Prunus armeniaca* (AAX33347.1). 3. *Tagetes erecta* (AAG10426.1). 4. *Momordica charantia* (AAR86105.1). 5. *Hydrilla verticillata* (AAT76434.1). 6. *Arabidopsis thaliana* (AAL15300.1). 7. *Nicotiana benthamiana* (ABE99707.1) 8. *Solanum tuberosum* (AAS17750.1). 9. *Gentiana lutea* (BAB82461.1). 10. *Daucus carota* (ABB52082.1). 11. *Oryza sativa* (AAD02489.1). 12. *Crocus sativus* (AAO24235.1). 13. *Coffea canephora* (ABC87739.1). 14. *Chrysanthemum × morifolium* (BAE79552.1). 15. *Mangifera indica* (This study)


Citrus × paradise (AAK51545.1)
Prunus armeniaca (AAX33347.1)
Tagetes erecta (AAG10426.1)
Momordica charantia (AAR86105.1)
Hydrilla verticillata (AAT76434.1)
Arabidopsis thaliana (AAL15300.1)
Nicotiana benthamiana (ABE99707.1)
Solanum tuberosum (AAS17750.1)
Gentiana lutea (BAB82461.1)
Daucus carota (ABB52082.1)
Oryza sativa (AAD02489.1)
Crocus sativus (AAO24235.1)
Coffea canephora (ABC87739.1)
Chrysanthemum × morifolium (BAE79552.1)
Mangifera Indica (This study)

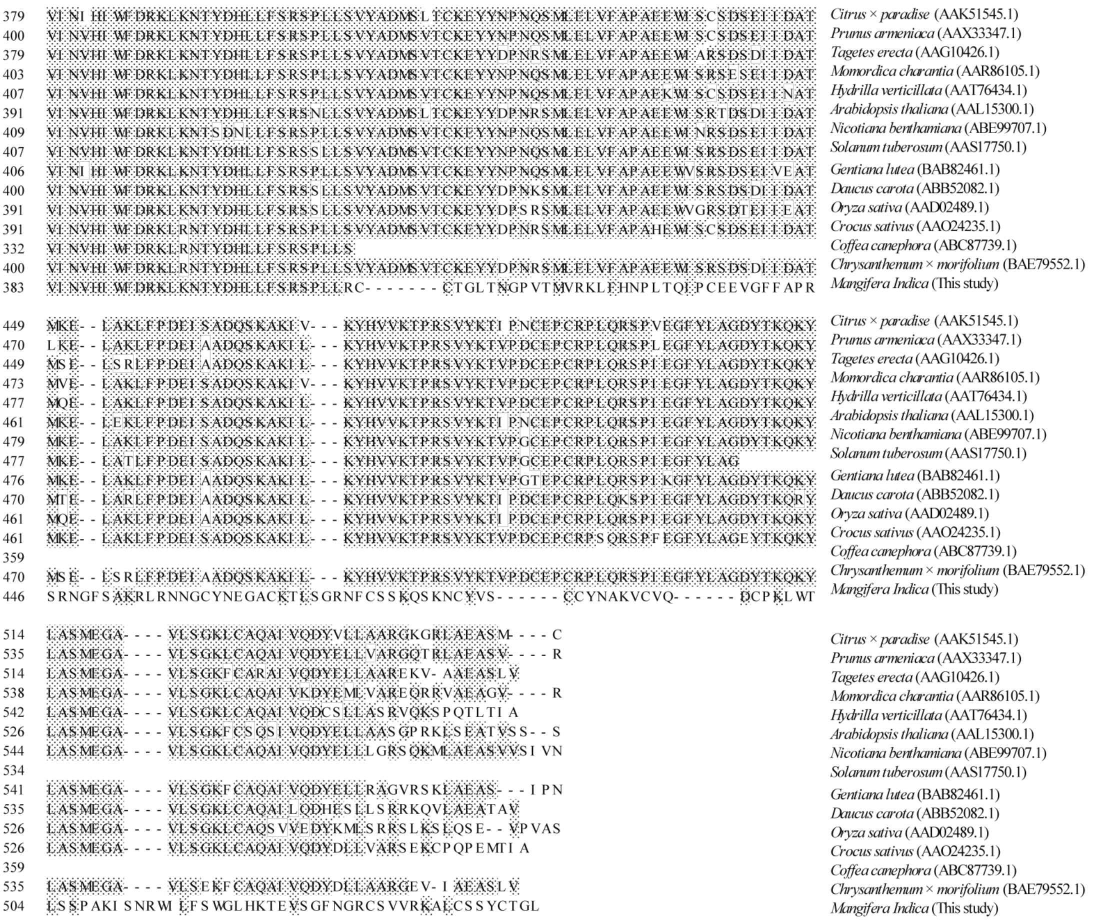


圖 6. 14 個不同植物與愛文芒果之 PDS 胺基酸序列之排序比較。

Fig. 6. Comparison of PDS amino acid sequences of 14 plant species and mango ‘Irwin’. Blue shade indicates the same amino acids, boxs are different amino acids and dashes(-) are residues which losing comparing with consensus sequence.

愛文芒果果實發育期類胡蘿蔔素總量之變化

愛文芒果的花朵與果實在發育後期均表現為黃色，組織內含有豐富類胡蘿蔔素。在果實發育過程中，若以遮光紙袋進行套袋則果皮顏色從綠色轉變為黃色，若以透光紙袋進行套袋則果皮顏色轉變為紅色，但是無論套袋與否或紙袋種類為何，果肉顏色終將由無色轉變為黃顏色。在果實發育初期 (stage 1)，總類胡蘿蔔素含量為 10.44 ± 0.33 mg/kg Fwt，而在果實完熟後 (stage 6) 總類胡蘿蔔素含量為 130.29 ± 7.76 mg/kg Fwt，總共增加 12.5 倍之多，特別是當果實發育生理成熟期 (stage 5) 後，開始進行內容物轉換時，類胡蘿蔔素的含量會開始大量累積 (34.90 ± 1.77 mg/kg Fwt)，此時期的胡蘿蔔素含量約為前面幾個時期的 3 倍量 (stage 2、3 及 4 分別為 11.33 ± 0.52; 10.17 ± 1.18; 13.17 ± 1.55 mg/kg Fwt)，而到完熟時 (stage 6) 類胡蘿蔔素得

累積達到最高量，並使果肉呈現漂亮的鮮黃顏色。若與葉片所累積的類胡蘿蔔素量相比較。因爲葉片需要進行光合作用，而類胡蘿蔔素最主要之功能爲保護葉綠素免於光氧化之破壞，因此在芒果成熟葉片中類胡蘿蔔素總量 (440.40 ± 3.94 mg/kg Fwt) 較成熟果實高約 3.5 倍 (圖 7)。

愛文芒果 PDS 基因在果實發育過程中的表現

利用芒果 *PDS* 專一性引子，對不同芒果發育時期的果肉部分進行基因相對表現量之檢測，PCR 循環次數在 32 次至 36 次之間，PCR 產物在 EthBr 染色下，呈現線性關係，顯示該循環次數內之 DNA 擴增成指數成長。經電泳後以 *actin* 基因擴增條帶亮度爲對照，計算其相對表現量，結果顯示在不同的果實發育時期，*PDS* 基因均有表現，表現幅度呈現微幅變動但逐漸減少之趨勢。當果實直徑大小爲 3 cm (stage 1) 時是表現量最高的時期，此時期相對表現量平均達 119.6%；果實大小爲 5 cm (stage 2)，該基因表現呈現下滑情形，平均相對表現量平均爲 105.5%；果實大小爲 7 cm (stage 3)，該基因平均相對表現量爲 90.8%；果實大小爲 9 cm (stage 4)，該基因之平均相對表現量約略上升爲 106.9%，與 stage 2 相當，仍低於第 1 時期。在果實綠熟的第 5 時期，呈現略微下降趨勢，平均相對表現量爲 102.4%，而果實黃熟的第 6 時期，*PDS* 平均相對表現量則降爲 99.3% (圖 8)。雖然各時期的基因表現呈現變動之趨勢，其變化幅度並不大，也未在果實轉色前才大量表現該基因，不論是哪一個發育時期的果實，其 *PDS* 表現量均較葉片的平均相對表現量 176.1%爲低。

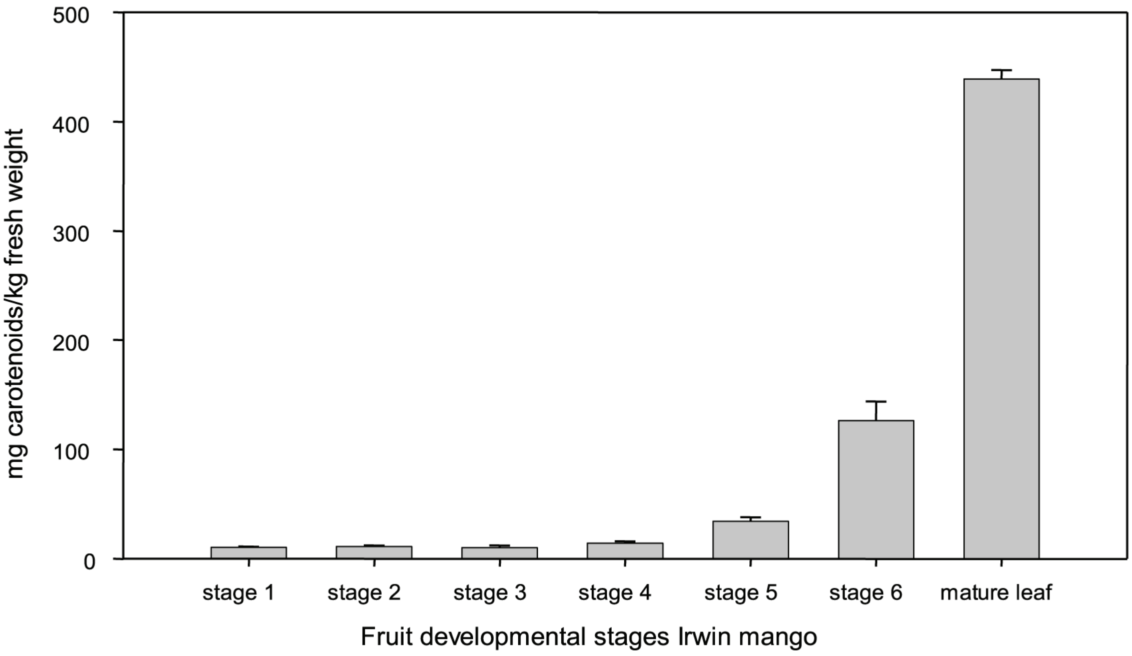


圖 7. 愛文芒果不同發育時期果實與葉片總類胡蘿蔔素含量。

Fig. 7. Carotenoid (mg/ kg Fwt) in mature leaves and fruits of mango 'Irwin' at six development stages.

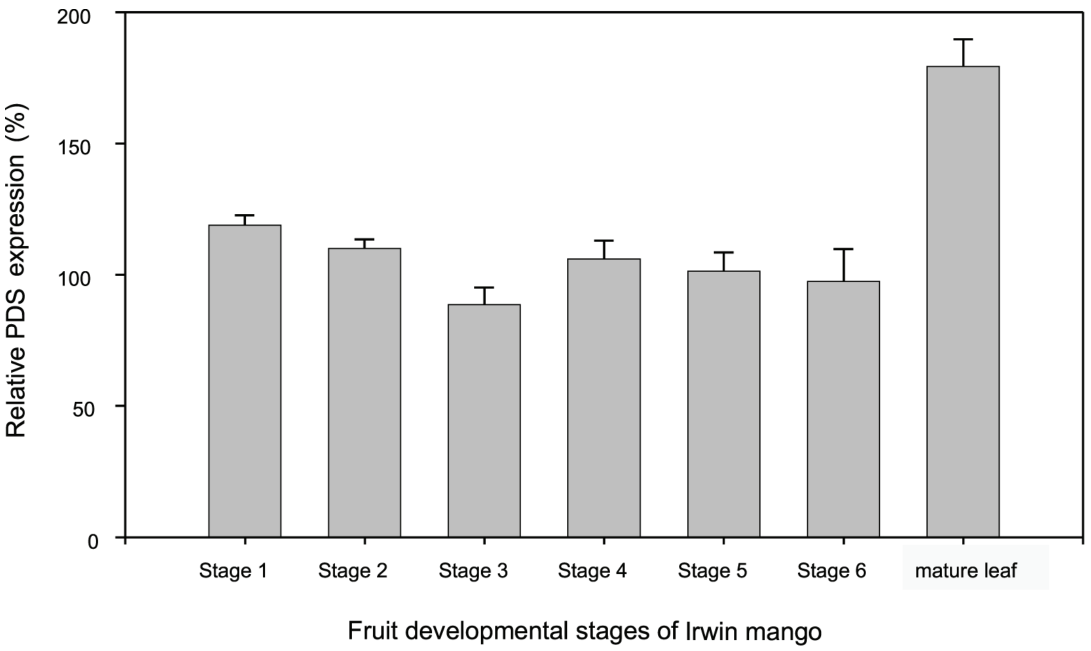


圖 8. 愛文芒果不同發育時期 *PDS* 基因與 *actin* 基因之相對表現量。

Fig. 8. Relative qPCR analysis of *PDS* expression in mango fruits at six development stages and mature leaves. Actin gene was used as an internal control.

討　　論

芒果是熱帶地區重要的果樹，具有香甜的風味，特別是鮮黃的果肉更是吸引人。芒果果實的顏色由累積類胡蘿蔔素而得，主要的胡蘿蔔素種類爲 all-trans-β-carotene, all-trans-violaxanthin 及 9-cis-violaxanthin (Mercadante *et al.* 1997)。在愛文芒果果實成熟過程中，類胡蘿蔔素總含量會隨著發育時期而增加，然而在果實發育到生理成熟期前，增加的幅度並不明顯，至果實達到生理成熟期後，果肉顏色才會漸漸轉變成黃色，此時類胡蘿蔔素總量快速增加，果肉也轉成鮮黃色。愛文芒果幼果 (stage1) 與成熟果 (stage 6) 的總胡蘿蔔素含量分別爲 10.44 mg/kg Fwt 與 145.28 mg/kg Fwt，且在果實發育達到生理成熟期後 (stage 5) 才開始快速累積類胡蘿蔔素，愛文芒果在果實達生理成熟期以後才開始大量累積總類胡蘿蔔素的模式與番茄相似 (Fraser *et al*. 1994)，也與龍膽花、萬壽菊花朵發育後期才快速累積類胡蘿蔔素的模式一致 (Zhu *et al*. 2004; Moehs *et al*. 2001)。雖然不同植物花朵與果實的類胡蘿蔔素累積方式相似，但是最終的類胡蘿蔔素含量增加的倍率卻有相當大的差異，龍膽花發育初期與後期的類胡蘿蔔素相差僅 2 倍，而萬壽菊相差可達 100 倍 (Zhu *et al*. 2004; Moehs *et al*. 2001)，本研究中愛文芒果在果實發育初期與後期的類胡蘿蔔素含量可以相差達 12.5 倍。

爲瞭解愛文芒果 *PDS* 在果實發育至成熟期的基因表現方式，本研究利用 cDNA 端點快速擴增法，選殖一個在果實表現影響類胡蘿蔔素生合成的關鍵基因 *PDS*，其 cDNA 全長爲 1,882 bp，含有

一個長達 1,644 bp 的解讀框架，可轉譯成 548 個胺基酸，5’端未轉譯區 36 bp 與黑藻 (AY669082.1) 的 6 bp 及萬壽菊 (AF251014.1) 的 70 bp 同屬較短的 5’端未轉譯區。其他如柑橘類 5’端為轉譯區約為 150 bp，如葡萄柚 (AF364515.1) 柳橙 (AJ319761.1)，龍膽花 (AB028665) 為 133 bp。3’端轉譯區在已經發表之植物中，柳橙、溫州蜜柑及萬壽菊等為 120 至 151 bp，而龍膽花、黑藻及阿拉伯芥 (NM117498.3) 則分別為 305、255 及 314 bp，本研究對象之 3’端未轉譯區為 202 bp，介於中間值。DNA 序列比對分析的結果顯示該基因與其他植物物種具有 60–68%的相似性，顯然該基因的核酸變動頗多，胺基酸序列的相似度則為 50.0%至 74.1%，胺基酸的一致性序列則集中在中間區域。靠近前端的 38 個胺基酸與靠近後端的 140 個胺基酸變化較大，PDS 的高保守區域位於胺基酸序列之中間區域。

類胡蘿蔔素生合成相關基因在不同植物、不同組織間的表現情形具有差異性。對於番茄而言，花朵在授粉後 *PDS* 的表現量比花盛開時增加 10 倍以上 (Fraser *et al*. 1994)，而龍膽花及辣椒花朵上類胡蘿蔔素生合成的 GGPP 合成酵素在果實成熟過程隨著果實發育逐漸增加表現量，其基因表現為正調節模式。但是在水仙花朵中另一個胡蘿蔔素生合成基因 *PSY* 的表現情形卻隨著花朵開放而明顯降低 (Zhu *et al*. 2004)，其基因表現模式為負調節模式。另外，在萬壽菊花朵的研究結果卻顯示總類胡蘿蔔素累積量與 *PSY* 及 *PDS* 基因表現量無正相關，認為此兩基因的表現量非胡蘿蔔素累積的主要因素 (Moehe *et al*. 2001)。筆者研究文心蘭花朵開放過程中花色與文心蘭 *PDS* 基因的表現，結果亦顯示文心蘭花朵黃色的表現主因為葉綠素降解，而非胡蘿蔔素的增加 (尚未發表)。番茄果實 *PYS* 與 *PDS* 基因表現量在授粉後分別增加 20 及 3 倍，認為此兩個基因在逆境及果實發育過程中的調控由不同機制所控制 (Giuliano *et. al* 1993)。Moehs *et al*. (2001) 於不同品種萬壽菊上的研究結果顯示，不同品種萬壽菊花朵之類胡蘿蔔素累積量可以相差達 100 倍，然而其生合成早期基因之表現量卻僅相差數倍，說明類胡蘿蔔素的累積並非單純由這些早期合成基因所完全掌控，其基因表現與類胡蘿蔔素的累積為複雜之調控方式。在本研究中愛文芒果類胡蘿蔔素早期合成基因 *PDS* 的表現情形及總類胡蘿蔔素類的累積與番茄 (Fraser *et al*. 1994) 及木瓜果實的表現模式一致 (Skelton *et al*. 2006)。在類胡蘿蔔素生合成過程中，光質與光線強度也會影響類胡蘿蔔素生合成基因的表現情形 (Welsch *et al*. 2000; Simkin *et al*. 2003)。一般而言，光線可增加許多植物 phytoene synthase mRNA 的轉錄 (Bartley & Scolnik 1993; Simkin *et al*. 2003)。而其他類胡蘿蔔素生合成基因的過度表現會顯現出回饋抑制作用 (feedback inhibition)，因而減緩其基因的表現程度，例如，phytoene desaturase and z-carotene desaturase 終產物的累積，會因為此兩個基因大量表現而被抑制 (Fraser *et al*. 1999)。此外，針對木瓜 Kapoho Solo 品種果實中 lycopene β-cyclase 基因在果實發育過程中的表現，隨著果實的發育，*LCY-B* 基因的表現會略為減少，呈現負向的調節作用 (Skelton *et al*. 2006)，本研究中，芒果果實 PDS 基因的表現模式可以類比木瓜 *LCY-B* 基因的表現方式。

本研究的結果顯示愛文種芒果不同發育時期 *PDS* 相對表現量並未隨著芒果果實發育而增加，特別是當果實達生理成熟期後開始大量累積類胡蘿蔔素，此時期 *PDS* 基因表現量卻反而降低，此與番茄 *PDS*、*LCY-B* 基因、木瓜 *LCY-B* 基因在果實發育過程中的調節方式相似 (Fraser *et al*. 1999 ; Skelton *et al.* 2006)，顯示了該基因在愛文芒果果實發育過程中亦為負調節模式。

水果的果皮色與果肉色為貿易與銷售上一個重要的指標，其中類胡蘿蔔素的含量與種類不僅影響果品的顏色，並與營養成分有密切關連，因此格外受到重視，芒果的果肉色也受到許多消費者的

注目，因此研究其果實後熟過程中顏色的變化與相關基因的表現情形具有重大意義。芒果的果肉色表現由類胡蘿蔔素而來，而類胡蘿蔔素生合成相關基因的研究，一直受到科學家們的重視，原因不外是因爲其抗氧化、人體必須營養元素、抗癌與保健等因素，在不同的作物及部分微生物中相關基因也已經被選殖並應用，例如將胡蘿蔔素生合成途徑的基因導入水稻創造的黃金米，受到世人的注意。然而由於不同物種對不同核酸序列的偏好性會造成轉基因作物表現情形的差異，因此對於將來需要進行轉基因的作物，確實有必要從該作物中選殖或直接修改該基因以求得轉基因作物最佳的表現，本研究首度自芒果中選殖到完整的類胡蘿蔔素生合成基因 *PDS* 並對其基因結構與胺基酸序列進行分析，亦研究其在不同果實發育時期基因表現程度，闡述了愛文芒果果實發育分子層次的研究成果。

誌　　謝

本試驗研究經費承行政院農業委員會補助及試驗期間鳳山熱帶園藝試驗分所同仁張鳳娥小姐、張鳳琴小姐及林承志先生盡心協助試驗工作，特此致謝。

引用文獻 (Literature cited)

Bartley, G. E. and P. A. Scolnik. 1995. Plant carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. Plant Cell 7:1027–1038.

Bramley, P. 2002. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. J. Exp. Bot. 53:2107–2113.

Fraser, P. D., M. R. Truesdale, C. R. Bird, W. Schunch, and P. M. Bramley. 1994. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: Evidence for tissue-specific gene expression. Plant Physiol. 105:405–413.

Fraser, P. D., J. W. Kiano, M. R. Truesdale, W. Schuch, and P. M. Bramley. 1999. Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit. Plant Mol. Biol. 40:687–698.

Giuliano, G., G. E. Bartley, and P. A. Scolnik. 1993. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. Plant Cell 5:379–387.

Klaui, H. and Bauernfield, J. C. 1981. Carotenoids as colorants and vitamin A precursors: Technological and nutritional applications (Bauernfeind, J. C., ed.) Academic Press, New York, NY. 47–317 pp.

Leblanc, C., A. Falciatore, M. Watanabe, and C. Bowler. 1999. Semi-quantitative RT-PCR analysis of photoregulated gene expression in marine diatoms. Plant Mol. Biol. 40:1031–1044.

Li, L., D. J. Paolillo, M. V. Parthasarathy, E. M. DiMuzio, and D. F. Garvin. 2001. A novel gene mutation that confers abnormal patterns of β-carotene accumulation in cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis). Plant J. 26:59–67.

Lichtenthaler, H. K. and A. R. Wellburn. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. Biochem. Soc. Trans. 11:591–592.

Mercadante, A. Z., D. B. Rodriguez-Amaya, and G. Britton. 1997. HPLC and mass spectrometric analysis of carotenoids from mango. J. Agric. Food Chem. 45:120–123.

Moehs, C. P., L. Tian, K. W. Osteryoung, and D. DellaPenna. 2001. Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. Plant Mol. Biol. 45:281–293.

Sandmann, G. 2001. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. Arch. Biochem. Biophys. 385:1, 4–12.

Simkin, A. J., A. M. Laboure, M. Kuntz, and G. Sandmann. 2003. Comparison of carotenoid content, gene expression and enzyme levels in tomato (*Lycopersicon esculentum*) leaves. Z. Naturforsch. 58:371–380.

Skelton, R. L., Q. Yu, R. Srinivasan, R. Manshardt, P. H. Moore, and R. Ming. 2006. Tissue differential expression of lycopene β-cyclase gene in papaya. Cell Res. 16:731–739.

Vishnevetsky, M. 1999. Molecular mechanisms underlying carotenogenesis in the chromoplast: Mutilevel regulation of carotenoid associated genes. Plant L. 20:423–431.

Welsch, R., P. Beyer, P. Hugueney, H. Kleinig, and J. von Lintig. 2000. Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. Planta 211:845–854.

Zhu, C. F., S. Yamamura, H. Koiwa, M. Nishihara, and G. Sandmann. 2002. cDNA cloning and expression of carotenogenic genes during flower development in *Gentiana lutea*. Plant Mol. Biol. 48:277–285.

Zhu, C. F., X. Chen, and Y. D. Wang. 2004. Carotenoid biosynthesis in plants and application of its relative genes in gene engineering. J. Plant Physiol. Mol. Biol. 30:609–618.

Cloning of Phytoene Desaturase Gene in Mango (*Mangifera indica* L. cv. Irwin) and Its Expression at Different Stages of Fruit Development[1]

Wen-Li Lee[2], Kuo-Dung Chiou[2], Rong-Quey Lin[2], Fure-Chyi Chen[3,4]

Abstract

Lee, W. L., K. D. Chiou, R. Q. Lin, and F. C. Chen. 2008. Cloning of phytoene desaturase gene in mango (*Mangifera indica* L. cv. Irwin) and its expression at different stages of fruit development. J. Taiwan Agric. Res. 57:213–229.

Mango (*Mangifera indica*) is a tropical fruit containing carotenoids. In order to understand the expression of phytoene desaturase *(PDS*), a key enzyme for the biosynthesis of β-carotene, during fruit development, we have cloned and characterized a cDNA encoding *PDS* from young mango fruits, cv. Irwin. Mango *PDS* cDNA contains 1,882 bp, with 1,644 bp open reading frame encoding for a polypeptide of 548 amino acid residues. The 5' and 3' untranslated regions (UTR) were 36 bp and 202 bp, respectively. The deduced amino acid sequence of this PDS has 50.0–74.1% of similarity to *PDS* from other plant species. The relative expression levels and carotenoids content of the Irwin mango PDS at the six fruit development stages and in mature leaves were detected. The result showed that the expression level of *PDS* gene at different fruit development stages was reduced and the carotenoids increased rapidly, when fruit are maturing. These findings suggest that mango *PDS* is down regulated during the fruit ripening process.

Key words: Mango, *Mangifera indica*, Carotenoids, Phytoene desaturase, Gene cloning, Gene expression .

---

1. Contribution No.2329 from Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: September 10, 2008.
2. Respectively, Assistant Horticulturist, Assistant Horticulturist, Associate Horticulturist, Feng-Shan Tropical Horticultural Experiment Branch, ARI, Feng-Shan, Taiwan, ROC.
3. Professor, Institute of Plant Science, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan, ROC.
4. Corresponding author, e-mail: fchen@mail.npust.edu.tw; Fax: (08)7740371.

台 灣 農 業 研 究 稿 約

一、本刊爲行政院農業委員會農業試驗所發行之學術性季刊，刊登農業試驗研究相關之研究稿件：

論　　說：由本所邀請專家撰寫。

研究報告：關於農業科學未曾發表之研究報告，按題目、作者、摘要、前言、材料與方法、結果、討論、結論 (一般略去)、誌謝 (可略去)、引用文獻等依序撰寫，圖與表附於其後，全文以不超過 10 印刷頁爲原則。

研究簡報：關於農業科學未曾發表之簡短原始研究報告，不須分章節撰寫，但須附中英文摘要，全文以不超過 4 印刷頁爲原則。

二、稿件應以中文或英文撰寫。來稿請送原稿及電子檔案各一份 (內各附照片原圖，繪製圖版可附原圖與影印圖片二份)。文稿以 A4 大小之白色紙張 (長 29.6 公分，寬 21 公分) 兩倍行高 (double space) 打字，12 號字體，左邊對齊，版面應上下預留 3 公分，左右 2 公分之空間，並自第二頁起在右下角以阿拉伯數字註明頁數。撰寫時，中文以細明體、英文以 Times New Roman 字體打字；英文字距一格，句距二格。審查接受之稿件，隨文請附紙本文稿一份與電子檔案，以利送審及電腦排版等作業。

三、稿件格式：

題　　目：宜簡短，能充分反應文旨，並附簡題 (Running title) (簡題 12 字以內)。英文題目除介系詞、連接詞等字外，每字第一字母應大寫。題目附小註，說明研究報告編號。

作　　者：作者姓名置中，中文名字間空一格；英文姓名則名在前姓氏在後，作者二人或二人以上時，以 “，” 相隔，最後一人前加 “and” 字樣，其表示方法如 Chen-Seng Huang, Chen-Chang Chen, and Chyr-Guan Chen。每一作者須附小註，以說明所屬機關單位，通訊作者須附電子郵件信箱與傳真機號碼。題目與作者同置第一頁。

摘　　要：不分段落、宜簡潔明確。摘要之前應加作者、年代、題目、期刊、及卷期，摘要之後應附關鍵詞 (Key words)，關鍵詞不超過五個，每個英文關鍵詞第一字母應大寫。摘要以不超過五百字爲原則。以中 (英) 文發表者須附英 (中) 文摘要，置於本文之後，且內容須與中 (英) 文摘要相符，並附稿件編號、作者、通訊作者之小註。

本　　文：依序爲前言 (INTRODUCTION)、材料與方法 (MATERIALS AND METHODS)、結果 (RESULTS)、討論 (DISCUSSION)、結論 (CONCLUSION)、誌謝 (ACKNOWLEDGEMENTS)、引用文獻 (LITERATURE CITED)。除學名、專有名詞、化學式、數學公式、數字、度量衡單位及縮寫外，文句中不得中外文並用，需使用英 (外) 文以助明瞭時，須將英 (外) 文括號置於中文之後。材料與方法、結果兩部份如有必要須分章節，每一章節內並可再分小章節，以助明瞭文稿內容。章節題目 (heading) 單行置於該章節之前，小章節題目 (subheading) 直接置於小章節之首。

表　　格：

1、每一表格應分別繕製，須以 word 中 “表格” 工具製作，上方須有標題，並按文中出現順序加上**表 1. (Table 1.)**，**表 2. (Table 2.)** 等冠號。

2、中文稿之表格標題應中英文並列，冠號與表幅齊頭，表內項目及內容以英文書寫。英文標題及各欄英文細目，除第一字之第一字母大寫外，餘均小寫。

3、表格應加分析、簡化與歸納後始可列表。每一表格應在文中標示清楚，以便對照。

4、表中內容如需說明，均須附加小註，以 z, y, x,…等縮小小寫字母置於右上角，並於表下依次敘述。表格僅列橫線。

5、性質類同之圖與表，務請精簡與合併。

圖　　片：

1、手繪圖版以黑色墨水分別繪圖紙或描繪紙（白色透明紙）上。如以電腦繪圖，請以鐳射印表機或同規格之印表機列印，力求清晰。

2、圖中加註者，應於圖中說明，或以括號註明於標題之後。

3、照片以光面紙爲原則，清晰度以縮小 50%可判讀爲宜。多幅照片儘量製成併版；如有特別指明，應加圈或箭頭表明。顯微照相，應加比例尺大小；照片大小以不超過版面（25 cm × 18 cm）爲宜。

4、圖版及照片下方應有標題（或另頁繕寫），並按文中出現的順序加上**圖 1 (Fig. 1)**、**圖 2 (Fig. 2)** 等冠號，在文中須標示清楚，以便對照。中文稿應中英文併寫，力求明確。

5、除併圖外，每一圖片應單頁製作。

6、照片、圖片背面應註上冠號及作者姓名，以免排印錯誤。

誌　　謝：不分段落，包括人物、經費來源等。誌謝可略去。

引用文獻：

1、引用文獻（Literature cited）－列舉確實曾引用之文獻。文獻以登載於學術性期刊、書籍、研討會之文章及學位論文爲限。文中涉及引用文獻時，根據該文獻的作者與年代加以括號：如（Sung 1991）、(Lo 1991, 1992)、(Chen & Ho 1983)、(Sung 1991; Hsu *et al*. 1992)，置於引用文處。

2、文獻須以英文撰寫，以姓名字母爲序。作者相同時以年代先後爲序。

3、文獻之書寫方法以期刊爲例，依序爲作者、年代、題目、期刊、卷期、頁數。

4、期刊名須用縮寫，其縮寫方式請參照（Biosciences Information Service, 1992）出版之 "Serial Sources for the BIOSIS Previews Database"。

5、文獻書寫範例如下：

(1) 原中文報告引用文獻出自學術性期刊

Hsu, S. H., T. Y. Chung, T. C. Kuo, and S. F. Wang. 1992. Studies on the micro-climate of greenhouse. I. Light environment of greenhouse. J. Agric. China 157:34-43. (in Chinese with English abstract)

(2) 原中文報告引用文獻出自著作性書籍

Sung, J. M. 1991. Nitrogen metabolism of rice. Chinese Agronomy Press. Taipei. 100 pp. (in Chinese)

(3) 原中文報告引用文獻出自編輯性書籍

Yang, C. M. and C. Y. Lin. 2003. Studies on rice precision farming system. p.1-12. *in*: Rice Precision Farming System. (Yang, C. M. and C. Y. Lin, eds.) Agric. Res. Inst. Pub. No. 105. Taichung. 252 pp. (in Chinese with English abstract)

(4) 原中文報告引用文獻出自研討會專刊

Chang C. A. 2001. Application and extension of virus-free seedling for the control of virus diseases of passionfruit in Taiwan. p.31-38. *in* the Proceeding of Symposium on Application of Healthy Plant for Control of Plant Diseases. Taiwan Phytopathol. Soc. Pub. Taichung. (in Chinese with English abstract)

四、單位、縮寫格式、括號及統計分析

1、所有度量衡均採公制，數量以阿拉伯數字，單位以英文縮寫表示；如：1 m、2 g、3 L、4 mL。各常用之縮寫單位參照說明如下：

(1)長度：公里（km）、公尺（m）、公分（=厘米）(cm)、公釐（=毫米）(mm)、微米（μm）。

(2)重量（W）：公斤（kg）、公克（g）、毫克（mg）、μg、公噸（t）。

(3)容積 (V)：公升 (L)、公撮 (=毫升) (mL)、μL。

(4)面積：公頃 (ha)、平方公尺 (m^2)、平方公分 (cm^2)。

2、溫度：攝氏 (℃)、絕對溫度 (K，但須加以說明)。

3、時間：時 (hr, hrs)、分 (min, mins)、秒 (sec, secs)。

4、濃度：莫耳 (M)、千分之一莫耳 (mM)、當量 (N)、千分之一當量 (mN) 。

5、重力加速度：*g*。

6、其他之縮寫：平均 (*av*)、大約 (*ca*)、直徑 (diam.)。

7、括號：使用半形括號 ( )，括號前後各空一格。

8、統計分析：達顯著性水準以*、**或處理間顯著差異區分，以 a、b、c、…表示者均應加註顯著機率值 *P* (例如 $P < 0.01$)；各統計量請採慣用符號，例如相關係數 (*r*) 、決定係數 (R)、變異係數 (cv)、標準機差 (se) 等。

五、生物學名以斜體字表示，屬名第一字母大寫。學名於摘要、本文、每一圖表中第一次出現時，須寫全名，如 *Citrus sinensis*；第二次出現時，屬名保留第一字母後加句點 “.”，種名全寫，如 *C. sinensis*。生物學名於本文中首次出現時應加註命名者。

六、稿件內容務須依照上列規定格式書寫，本期刊編輯委員保有修改與退稿之權利。文稿經本期刊接受後，作者得送含文稿內容之磁片或電子檔案 (IBM 相容電腦之文書管理檔，如 Word 檔或其他) ，並由作者負責前二校。除筆誤與錯字外，作者在校稿時，不得擅自更改內容與數據。

七、投稿本期刊之稿件，不得投稿其他刊物。稿件經本期刊接受後，刊登權屬農試所所有，非經本所書面同意，不得轉載或移轉他處發表。

八、來稿經編審委員會審查合格後刊登，由本刊印贈抽印本 50 本；彩色頁印刷及抽印本加印費用由投稿人自行負擔。

九、其他未盡事宜本期刊得隨時修正或補充。

台 灣 農 業 研 究

（原中華農業研究）

第五十七卷　第三期

中華民國九十七年九月出版

發 行 人：劉 大 江
總 編 輯：方 尚 仁
主　　編：吳 宜 晏　陳 盈 佑
編審委員：
生技組：吳 明 哲（主審）
作物組：歐 錫 坤（主審）
呂 秀 英　黃 肇 家　楊 純 明　劉 新 裕
施 昭 彰　徐 信 次　劉 政 道
農化組：郭 鴻 裕（主審）
簡 宣 裕　劉 滄 棽
植病組：安 寶 貞（主審）
蔡 武 雄　鄧 汀 欽　謝 廷 芳
應動組：王 清 玲（主審）
陳 健 忠　鄭　允　溫 宏 治
農工組：蔡 致 榮（主審）
黃 禮 棟　梁 連 勝
種原組：黃 勝 忠（主審）
農經組：潘 德 芳（主審）

另聘請各大學院校及研究機關相關學者專家擔任審查委員

Vol. 57, No. 3 Sep, 2008

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

(Formerly Journal of Agricultural Research of China)

PUBLISHER: Liu, Dah-Jiang

EDITOR IN CHIEF: Fang, Shan-Jen

EDITORS:

Wu, Yi-Yan   Chen, Ying-You

EDITORIAL BOARD:

Ann, Pao-Jen (Plant Pathology)
Guo, Horng-Yuh (Agriculture Chemistry)
Huang, Sheng-Chung (Crop Genetic Resources)
Ou, Shyi-Kuan (Crop Science)
Pan, Te-Fang (Agriculture Economics)
Tsay, Jyh-Rong (Agriculture Engineering)
Wang, Chin-Ling (Applied Zoology)
Wu, Min-Tze (Biotechnology)

EDITORIAL ADVISORY BOARD:

Chen, Chien-Chung
Cheng, Edward Yun
Chien, Shiuah-Yuh
Deng, Ting-Chin
Hsieh, Ting-Feng
Hsu, Hsin-Tszu
Huang, Chao-Chia
Huang, Li-Duhng
Liang, Lien-Sheng
Liou, Tsung-Dao
Liu, Sin-Yie
Liu, Tsang-Sen
Lu, Hsiu-Ying
Shih, Jau-Chang
Tsai, Wu-Hsiung
Wen, Hung-Chich
Yang, Chwen-Ming

Reviewers of the related fields are also invited from universities and other research organizations.

台灣農業研究第五十七卷第三期

出 版 者：行政院農業委員會農業試驗所
發 行 人：劉大江
總 編 輯：方尚仁
地　　址：台中縣霧峰鄉萬豐村中正路一八九號
網　　址：htpp://www.tari.gov.tw
電　　話：(04)2330-2301～5
印 製 者：學安文化事業有限公司
地　　址：台中市南區仁和二街七十八號
電　　話：(04)2286-1600
出版日期：九十七年九月三十日
展 售 處：國家書店松江門市　台北市松江路三段 209 號
電話：(02)2518-0207
五南文化廣場　400 台中市中山路 6 號
電話：(04)2226-0330

Sep, 2008

Journal of Taiwan Agricultural Research

(Formerly Journal of Agricultural Research of China)

Vol. 57, No.3

Research Reports

Diallel Analysis of Kernel Weight and Pericarp Characters in Tainan-White Maize (*Zea mays* L.) Population

Guang-Jauh Shieh 153

Multivariate Analysis of Amino Acid Composition in Proteins from Rice Bacterial Blight Resistance Genes

Meng-Li Wei, Yi-Han Chung, Chun-Tang Lu, and Hsiu-Ying Lu 161

Field Assessment of Agronomic Performance and Biosafety of Phytase-gene Transformed Rice

Ching-Shan Tseng, Min-Tze Wu, Hung-Chang Huang, Ming-Hsing Lai, and Chyr-Guan Chern... 175

Risk Assessment of the Bioproduct of *Anoectochilus formosanus* Hayata I. Acute Toxicity of the Taiwan Jin-Yuan Wine in Rats

Yih-Juh Shiau, Jiunn-Wang Liao, and Min-Tze Wu 183

Screening Technique for Salt Tolerance in the Rice Seedling Stage

Woei-Shyuan Jwo, Chyr-Guan Chern, Ming-Hsin Lai, Hsin-Mu Yen, Tung-Hai Tseng, and Hungchen Emilie Yen 193

Studies on Fruits Internal Browning of Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) by Harvest Method

Pai-Chi Syue, Chia-Hui Tang, and Tan-Cha Lee 205

Cloning of Phytoene Desaturase Gene in Mango (*Mangifera indica* L. cv. Irwin) and Its Expression at Different Stages of Fruit Development

Wen-Li Lee, Kuo-Dung Chiou, Rong-Quey Lin, Fure-Chyi Chen 213

ISSN 0022-4847

9 770022 484003

Published by The Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture Taichung, Taiwan, Republic of China

行政院新聞局出版事業登記證局版臺省誌字第二九八號 中華郵政中臺字第〇三〇九登記為雜誌交寄

GPN 2009500560

定價：新台幣一七五元